



**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)**

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 15/12, C07K 14/72, C12N 15/62, A01K 67/027, A61K 38/16, C12N 15/90, 9/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/31108  (43) Date de publication internationale: 28 août 1997 (28.08.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00315  (22) Date de dépôt international: 20 février 1997 (20.02.97)			(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regime-beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).
(30) Données relatives à la priorité: 96/02060 20 février 1996 (20.02.96)		FR	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): AS-SOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN GENETIQUE MOLECULAIRE (ADEREGEM) [FR/FR]; 26, rue Montpensier, F-75001 Paris (FR).			Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(72) Inventeurs; et  (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BROCARD, Jacques, Bertrand [FR/FR]; 35, rue Finkwiller, F-67000 Strasbourg (FR). CHAMBON, Pierre, Henri [FR/FR]; 4, rue A.-Schweitzer, F-67113 Blaesheim (FR). GRONEMEYER, Hinrich [DE/DE]; Uhlandstrasse 1 A, D-77704 Oberkirch (DE). METZGER, Daniel [FR/FR]; 21, avenue Jean-Jaurès, F-67100 Strasbourg (FR). NICOLAS, Jean-Claude [FR/FR]; Le Phaéton, 36, allée Marie-Laurencin, F-34090 Montpellier (FR). ROUX, Sylvie [FR/FR]; Mas d'Artis, 574, rue de la Madeleine, F-34074 Montpellier (FR).			
  (54) Titre: MODIFIED NUCLEAR GLUCOCORTICOID RECEPTOR, FUSION PROTEIN, AND DNA FRAGMENTS CODING FOR SAID RECEPTOR AND SAID FUSION PROTEIN  (54) Titre: RECEPTEUR NUCLEAIRE DE GLUCOCORTICOIDES MODIFIÉ, PROTEINE DE FUSION, FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR LE RECEPTEUR ET LA DITE PROTEINE DE FUSION  (57) Abstract  A DNA fragment coding for a modified nuclear glucocorticoid receptor, particularly one mutated in the region coding for the ligand binding domain, so that receptor activity is more strongly inducible by a synthetic glucocorticoid ligand than by a natural glucocorticoid ligand, is disclosed. A recombination system inducible in mammals by means of a fusion protein produced between a recombinase and the binding domain of the ligand derived from the modified glucocorticoid receptor of which the activity is more strongly inducible by synthetic glucocorticoids than by natural glucocorticoids, is also disclosed.  (57) Abrégé  La présente invention concerne un fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes modifié, notamment muté dans la région codant pour le domaine de liaison du ligand, de sorte que l'activité dudit récepteur est inducible plus fortement par un ligand glucocorticoïde synthétique que par un ligand glucocorticoïde naturel. La présente invention concerne également un système de recombinaison inducible chez les mammifères, grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion réalisée entre une recombinase, et le domaine de liaison du ligand, dérivé du récepteur des glucocorticoïdes modifié, dont l'activité est plus fortement inducible par des glucocorticoïdes synthétiques, que par des glucocorticoïdes naturels.			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

RECEPTEUR NUCLEAIRE DE GLUCOCORTICOÏDES MODIFIÉ, PROTEINE DE FUSION,  
FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR LEDIT RECEPTEUR ET LADITE PROTEINE DE FUSION

5

La présente invention concerne un fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes (GR) modifié, et un fragment d'ADN codant pour un domaine de liaison du ligand (LBD) dudit récepteur, ainsi qu'un fragment d'ADN codant pour une protéine de fusion comportant ledit récepteur ou ledit domaine de liaison du ligand dudit récepteur fusionné à une protéine dont l'activité est induite en présence de ligands glucocorticoïdes.

La présente invention concerne également un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes modifié, notamment le récepteur humain et son domaine de liaison du ligand modifié, ainsi qu'une protéine de fusion comportant ledit récepteur ou ledit domaine de liaison du ligand.

La présente invention concerne également un vecteur d'expression conditionnelle d'une protéine, notamment une protéine étrangère dans des cellules hôtes humaines ou animales, notamment des cellules de mammifères. La présente invention se rapporte aussi à un procédé d'expression d'une protéine dans lesdites cellules. Par ailleurs, la présente invention concerne un procédé d'excision, insertion, inversion, ou translocation conditionnelle d'un fragment d'ADN dans des cellules hôtes humaines ou animales, notamment de mammifères.

25 La présente invention concerne en outre un vecteur de transfert d'un fragment d'ADN dans lesdites cellules hôtes humaines ou animales, notamment de mammifères, et son utilisation comme médicament, comme outil d'analyse et étude du fonctionnement d'un gène ainsi qu'une méthode de traitement de cellules ex vivo ou in vitro.

30 Enfin, la présente invention concerne les cellules humaines ou animales transfectées par un vecteur d'expression et/ou de transfert selon l'invention ainsi que les animaux transgéniques qui en dérivent.

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est une protéine régulatrice de transcription de gènes qui médie l'action des glucocorticoïdes dans les cellules cibles. Le GR et d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (facteurs de transcription activés par des ligands) présentent une structure modulaire commune. La région N-terminale variable contient l'activité de transactivation constitutive AF-1. Le domaine central de liaison à l'ADN (DBD) est hautement conservé entre les différentes espèces et permet la liaison du récepteur à son élément de réponse ADN apparenté (GRE dans le cas du GR). Le domaine de liaison du ligand (LBD), localisé dans la région C-terminale du GR, non seulement fixe le ligand, mais également comporte de multiples activités distinctes : une surface pour l'interaction avec hsp90 et une surface distincte pour l'homodimérisation, un signal de localisation nucléaire et une fonction de transactivation AF-2 dépendant du ligand (pour les articles de synthèse et références, voir (1-5)). Le domaine LBD est fortement conservé entre les différentes espèces. Une fonction de transactivation AF-2 a été identifié dans la partie C-terminale de divers LBD (6-10). L'intégrité de la partie centrale de la région contenant AF-2 est requise pour l'activation de transcription, dépendante de ligand, par les récepteurs nucléaires correspondants, et pour l'interaction, entre cette région et des facteurs intermédiaires transcriptionnels apparentés (TIF, également dénommés co-activateurs ou médiateurs) (11-19). Il a été proposé un modèle général (19) dans lequel la liaison du ligand induit un changement conformationnel du domaine de liaison du ligand en faisant intervenir en particulier la région C-terminale hébergeant la partie centrale de AF-2, en engendrant ainsi une surface pour une interaction efficace avec les TIF. Les LBD des récepteurs nucléaires contiennent des régions conservées possédant une structure canonique en hélice. Ces données structurales ont permis d'effectuer un alignement commun pour les LBD de tous les récepteurs nucléaires. L'hélice H12 contient la fonction de transactivation AF-2 (19). Les acides aminés des hélices H11 et H12, notamment des récepteurs des glucocorticoïdes de différentes espèces telles que l'homme, le rat, la souris et le xénope, sont conservés.

Plusieurs mutations dans le LBD de GR ont été décrites précédemment. On peut distinguer deux types majeurs de mutations :

- le premier type consiste en mutations qui affectent positivement ou négativement l'affinité de liaison au ligand. Par exemple, les remplacements du résidu cystéine 656 par la glycine dans le GR de rat (20) et du résidu méthionine 565 par l'arginine ou du résidu alanine 573 par la glutamine dans le GR humain (hGR)(21) augmentent l'affinité de liaison au ligand et conduisent à un décalage de la courbe de réponse en fonction de la dose pour la transactivation en direction des plus basses concentrations de ligand. Ces mutants sont par conséquent désignés par "super GR". De même, on a rapporté des mutants ayant une affinité de liaison au ligand plus faible (21-24). Les mutations de LBD qui décalent la courbe de réponse en fonction de la dose de ligand en direction des plus hautes concentrations de ligand, résultent d'une affinité altérée de liaison de l'hormone (25-26) ;
- le second groupe de mutants LBD comprend ceux affectant la fonction d'activation transcriptionnelle (AF-2), sans altérer la liaison au ligand. Comme exemples, on peut citer des mutations dans la région contenant AF-2 qui sont liées à une perte ou une diminution du potentiel de transactivation, mais n'affectent pas l'affinité de liaison au ligand (6-10).

La fusion du domaine de liaison du ligand (LBD) de récepteurs nucléaires à des protéines hétérologues a permis de contrôler, dans de nombreux cas, l'activité de ces dernières.

Les activités de Myc, c-Abl, Src, erbB1, Raf, E1A Cre et FLP, peuvent être modulées en réalisant des protéines de fusion avec le LBD de récepteurs nucléaires (27-29). Cependant, les ligands de ces récepteurs sont présents dans de nombreux systèmes biologiques, pouvant ainsi induire un niveau d'activité basal. Pour éviter de tels problèmes, un LBD muté du récepteur des oestrogènes (RE), a été fusionné à la protéine c-Myc (30), ou aux recombinases Cre et FLP (28 et 29).

Les recombinases de la famille des intégrases λ catalysent l'excision, l'insertion, l'inversion ou la translocation de fragments d'ADN au niveau de sites spécifiques de reconnaissance desdites recombinases (31-36). Les recombinases sont actives dans les cellules animales (35).

5 La recombinase Cre, une intégrase de 38 KDa du bactériophage P1, catalyse la recombinaison entre deux séquences d'ADN de 34 paires de bases appelées loxP en l'absence de cofacteurs (32, Figure 1).

La position sur une ou plusieurs molécules d'ADN et l'orientation de sites loxP l'un par rapport à l'autre déterminent le type de fonction de la 10 recombinase, excision, insertion, inversion ou translocation notamment, la recombinase Cre (figure 1). Ainsi l'activité recombinase de Cre est une inversion lorsque deux sites LoxP sont tête-bêche sur un même fragment d'ADN et une excision, lorsque les sites LoxP sont en répétition directe sur un même fragment d'ADN. L'activité de la recombinase est une insertion 15 lorsqu'un site loxP est présent sur un fragment d'ADN, une molécule d'ADN telle qu'un plasmide contenant un site loxP pouvant être insérée au niveau dudit site loxP (figure 1). La recombinase Cre peut également induire une translocation entre deux chromosomes à condition qu'un site loxP soit présent sur chacun d'eux (37) (figure 1). De manière plus 20 générale, la recombinase Cre est donc capable d'induire la recombinaison entre une ou plusieurs molécules d'ADN différentes, à condition qu'elles soient porteuses de sites loxP.

De même la recombinase FLP, une recombinase de 43 KDa de Saccharomyces cerevisiae, est capable du même type d'action sur les 25 fragments d'ADN contenant des sites de reconnaissance FRT (34).

En réalisant une protéine de fusion (chimère) entre la recombinase Cre et la région C-terminale du récepteur humain des oestrogènes contenant une Valine en position 400, on obtient une molécule capable 30 d'exciser, en présence du ligand du récepteur, l'oestradiol, les séquences d'ADN localisées entre deux sites loxP, ainsi qu'un des sites loxP, lorsque ceux-ci sont en répétition directe, alors qu'en absence de ligand, l'excision n'a pas lieu (28).

L'activité de la recombinase FLP est également régulable, en réalisant des chimères entre la FLP et le domaine de liaison de récepteurs nucléaires. En fusionnant la FLP avec le LBD du récepteur des oestrogènes ou du récepteur des glucocorticoïdes en l'absence de ligand, l'activité recombinase est très faible, alors qu'elle est rapidement induite par les ligands respectifs des LBD (29).

Toutefois, l'utilisation de protéines de fusion entre des recombinases et des LBD de récepteurs nucléaires pour exciser de façon contrôlée des fragments d'ADN situés entre des sites de reconnaissance desdites recombinases peut poser problème, étant donné que les concentrations de ligand présentes chez l'animal ou dans les milieux de culture des cellules peuvent être suffisantes pour induire au moins partiellement, l'activité recombinase.

La présente invention fournit un système de recombinaison inductible chez les animaux, notamment les mammifères, grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion réalisée entre une recombinase, et le domaine de liaison du ligand, dérivé du récepteur des glucocorticoïdes, dont l'activité est inductible par des glucocorticoïdes synthétiques, mais pas par des glucocorticoïdes naturels notamment à des concentrations inférieures à  $10^{-6}$  M c'est-à-dire physiologiques.

Pour éviter l'induction de l'activité recombinase de la protéine chimère par les ligands endogènes, la présente invention se propose de fournir en effet une mutation dans le LBD du récepteur des glucocorticoïdes lui permettant d'être plus fortement activé en présence de ligands glucocorticoïdes synthétiques, qu'en présence de ligands glucocorticoïdes naturels aux concentrations physiologiques .

La présente invention a en effet pour objet un récepteur nucléaire des glucocorticoïdes modifié, notamment muté dans la région du domaine de liaison du ligand, de sorte que l'activité dudit récepteur est inductible plus fortement par un ligand glucocorticoïde synthétique que par un ligand glucocorticoïde naturel.

Selon la présente invention on entend par "récepteur (muté) des glucocorticoïdes inductible plus fortement par un ligand glucocorticoïde synthétique que par un ligand glucocorticoïde naturel" que l'activité du

récepteur muté selon l'invention est induite plus fortement par des ligands glucocorticoïdes synthétiques que par des ligands glucocorticoïdes naturels à une concentration donnée et que le récepteur muté des glucocorticoïdes selon l'invention est beaucoup moins sensible aux glucocorticoïdes naturels que le récepteur sauvage.

Par "activité dudit récepteur" on entend ici l'activité transcriptionnelle dudit récepteur et/ou le cas échéant l'activité de régulation de l'activité d'une protéine fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand, induite en présence de glucocorticoïdes. On cite plus particulièrement l'activité d'une protéine recombinase fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand dudit récepteur.

Par "glucocorticoïdes naturels", on entend ici des hormones stéroïdes sécrétées par le cortex des glandes surrenales telles que le cortisol, la corticostérone, ou l'aldostérone. Par "glucocorticoïdes synthétiques", on entend des agonistes de synthèse chimique dudit récepteur pour l'activité concernée. On cite parmi ceux-ci, la dexamethasone, le triamcinolone acetonide, le RU 486, le RU 28362, le bimedazol, le fluocinolone acetonide.

Certains ligands synthétiques seront agonistes pour induire une activité particulière du récepteur et antagonistes par rapport à une autre activité du récepteur. Ainsi, le composé RU 486 induit l'activité d'une protéine recombinase fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand du récepteur mais n'induit pas l'activité transcriptionnelle du récepteur.

Le ligand glucocorticoïde synthétique peut se lier au récepteur nucléaire sauvage (non muté), mais il se peut que ledit ligand synthétique se lie au récepteur muté et pas au récepteur naturel. Il se peut aussi que si ledit ligand synthétique se lie au récepteur sauvage, l'activité de celui-ci ne soit néanmoins pas induite par liaison au ligand synthétique.

On a en particulier, identifié une mutation dans le domaine LBD des récepteurs nucléaires des glucocorticoïdes (isoleucine --> thréonine) située entre les hélices H11 et H12 (19). Cette mutation entraîne une perte

d'activité du récepteur en présence de glucocorticoïdes naturels. Plus précisément, ce récepteur des glucocorticoïdes muté entre H11 et H12 n'a pas ou très peu d'activité transcriptionnelle en présence de glucocorticoïdes naturels aux concentrations physiologiques naturelles de 5 ceux-ci notamment des concentrations inférieures à  $10^{-6}$  M. Son activité peut cependant être induite par des ligands glucocorticoïdes synthétiques, notamment la dexamethasone (dex).

La présente invention a plus particulièrement pour objet un récepteur humain muté appelé hGR (I747/T) caractérisé en ce qu'il a pour 10 séquence, la séquence en acides aminés du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes sauvage avec une mutation isoleucine --> thréonine en position 747, et plus particulièrement encore un récepteur nucléaire humain modifié qui a pour séquence en acides aminés, une séquence substantiellement telle que représentée dans l'IDS n° 1.

15 La mutation de l'isoleucine 747 en thréonine dans la partie C-terminale du domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur des glucocorticoïdes altère la capacité des ligands naturels à en induire l'activité de transactivation. Les glucocorticoïdes naturels tels que le cortisol, l'aldostérone ou la corticostérone sont très faiblement actifs ou 20 totalement inactifs avec le mutant GR (I747/T), tandis que des glucocorticoïdes synthétiques tels que la dexaméthasone (Dex) stimulent efficacement la transactivation médiée par GR (I747/T). Toutefois, la courbe correspondante de réponse en fonction de la dose de ligand, pour la transactivation induite par Dex, est décalée vers les plus fortes 25 concentrations, par comparaison avec celle obtenue avec le GR de type sauvage (TS). Ni le décalage, ni l'inaptitude du cortisol à activer efficacement GR (I747/T) ne sont dûs à une affinité altérée de liaison au ligand *in vitro*.

En effet, la mutation dans le LBD de GR (I747/T) n'altère pas 30 sensiblement l'affinité de liaison au ligand *in vitro*. Toutefois, ce mutant présente un important décalage par rapport au GR TS de la courbe d'activité vers les fortes concentrations de ligands. Aussi des concentrations dites physiologiques de ligands glucocorticoïdes naturels suffisantes pour activer le GR TS, n'entraînent qu'une activité résiduelle 35 ou nulle chez le GR mutant.

Ce mutant diffère des autres mutants de LBD de GR décrits précédemment (22, 38), dont la fonction d'activation altérée est en étroite corrélation avec une modification de leurs propriétés de liaison au ligand *in vitro*.

5 La présente invention a aussi pour objet un domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire de glucocorticoïdes selon l'invention et particulièrement, le domaine LBD [GR(I747/T)] caractérisé en ce qu'il a une mutation isoleucine --> thréonine entre les hélices H11 et H12. Plus particulièrement il a pour séquence, la séquence en acides aminés du 10 domaine de liaison du ligand du récepteur des glucocorticoïdes humain substantiellement telle que représentée dans l'IDS n° 1 de l'acide aminé 532 à l'acide aminé 777 avec une mutation isoleucine --> thréonine en position 747.

15 La présente invention fournit également un fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes modifié, notamment muté dans la région du domaine de liaison du ligand (LBD) selon l'invention, ainsi qu'un fragment d'ADN codant pour un domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur modifié selon l'invention.

20 La présente invention a donc plus précisément pour objet un fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire des glucocorticoïdes sauvage avec une mutation de l'isoleucine en thréonine située entre les hélices H11 et H12 de la séquence d'acides aminés dudit récepteur, et plus particulièrement encore un fragment d'ADN caractérisé en ce qu'il a pour 25 séquence, une séquence codante du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes dont la séquence en acides aminés est substantiellement telle que représentée dans l'IDS n°1.

Dans un mode de réalisation, la présente invention a pour objet un 30 fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, la séquence de l'ADNc du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes substantiellement telle que représentée dans l'IDS n° 1 comportant le codon ACC codant pour la thréonine en position 747 de la séquence d'acides aminés dudit récepteur.

De même la présente invention a pour objet un fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes modifié avec une mutation isoleucine --> thréonine située entre les hélices H11 et H12 et notamment en position correspondant à la position 747 de la séquence en acides aminés du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes.

Plus particulièrement, la présente invention fournit un fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes modifié, caractérisé en ce qu'il a pour 10 séquence, une séquence codant pour les acides aminés du domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes dont la séquence en acides aminés est实质iellement telle que représentée dans l'IDS n° 1 de l'acide aminé 532 à l'acide aminé 777.

Plus particulièrement encore, la présente invention fournit un 15 fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, la séquence d'ADNc codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes实质iellement telle que représentée dans l'IDS n° 1 du codon 532 au codon 777 avec le codon ACC en position 747.

La présente invention a en outre pour objet un système vectoriel 20 d'expression conditionnelle d'une protéine notamment une protéine étrangère dans des cellules hôtes comportant un élément de contrôle de la transcription inducible par un complexe formé par un récepteur nucléaire des glucocorticoïdes et un ligand, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un premier fragment d'ADN consistant en un fragment d'ADN codant pour ladite protéine sous le contrôle d'éléments assurant son expression dans lesdites cellules hôtes, lesdits éléments assurant son expression comprenant une séquence de contrôle de transcription (RE) inducible par le récepteur selon l'invention complexé à un 25 ligand glucocorticoïde synthétique, et

- un deuxième fragment d'ADN consistant en un fragment d'ADN fonctionnel codant pour ledit récepteur selon l'invention ou seulement une partie dudit fragment comprenant la région qui reconnaît le ligand (LBD) selon l'invention, et la région de liaison à l'ADN (DBD) qui se fixe sur ladite séquence de contrôle de la transcription (RE).

- lesdits premier et deuxième fragments d'ADN pouvant être portés par un même vecteur ou deux vecteurs séparément.

Dans un mode de réalisation, le système vectoriel comporte l'ADNc

10 codant pour :

- la région LBD, représentée par des codons codant les acides aminés n° 532 à 777 dans l'IDS n° 1, et

- la région DBD, représentée par des codons codant les acides aminés n° 421 à 487 dans l'IDS n° 1.

15 Certaines cellules ont du GR endogène qui peut être activé par des ligands naturels et des ligands synthétiques. Si on veut activer un gène donné à volonté dans de telle cellules, sans qu'il puisse être activé par les ligands endogènes ni par les récepteurs endogènes, il faut que ce gène contienne un RE différent du GRE et utiliser un activateur chimérique 20 comportant le DBD correspondant et un LBD muté selon l'invention. Ce gène pourra donc être activé par des ligands synthétiques, mais non par des ligands naturels.

C'est pourquoi dans un mode de réalisation, on remplace le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur des glucocorticoïdes par celui d'un autre transactivateur, notamment celui de la protéine de levure Gal 4 et on remplace la séquence de contrôle de transcription (RE) du récepteur des glucocorticoïdes par celle d'un autre transactivateur, notamment la séquence 17 mère (17m) reconnue par la protéine Gal4.

30 La présente invention a donc également pour objet un procédé d'expression d'une protéine étrangère dans des cellules humaines ou animales notamment de mammifères, caractérisé en ce que l'on cultive des cellules qui contiennent un système vectoriel d'expression selon l'invention, et en ce qu'on ajoute ledit ligand synthétique, dans le milieu de culture, puis on récupère la protéine synthétisée.

Les ligands glucocorticoïdes synthétiques diffusent librement dans les cellules lorsqu'ils ajoutés dans le milieu de culture ou injectés dans un animal.

Dans ce procédé on utilisera en particulier un ligand synthétique choisi parmi la dexaméthasone, le triamcinolone acétonide, le RU2836, le bimétrazole, le déacylcortivazol et le fluocinolone acetonide.

La présente invention a en outre pour objet une protéine de fusion comprenant un récepteur selon l'invention ou un domaine de liaison du ligand selon l'invention et une protéine dont l'activité est inducible plus fortement par liaison dudit récepteur ou dudit domaine de liaison du ligand (LBD) dudit récepteur avec undit ligand glucocorticoïde synthétique qu'avec un ligand glucocorticoïde naturel.

En particulier, la présente invention a pour objet une protéine de fusion qui comprend une protéine recombinase et plus particulièrement de la famille des intégrases λ et plus particulièrement encore, la protéine Cre du bactériophage P<sub>1</sub>.

Dans un mode de réalisation, la protéine de fusion comporte la partie C-terminale de la région charnière D du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes, intercalée entre la protéine Cre et ledit domaine de liaison du ligand du récepteur modifié selon l'invention.

L'activité recombinase proprement dite de la protéine de fusion est similaire à celle de Cre. Elle permet donc, comme Cre, d'exciser ou d'inverser des séquences d'ADN localisées entre des sites loxP, d'insérer un plasmide contenant un site loxP au niveau d'un site loxP localisé dans le génome, ou d'effectuer une translocation entre deux chromosomes contenant chacun un site loxP.

La présente invention a également pour objet un gène de fusion codant pour la protéine de fusion selon l'invention comprenant un fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes modifié ou un domaine de liaison du ligand dudit récepteur selon l'invention, ainsi qu'un fragment d'ADN codant pour une protéine dont on veut réguler l'activité, ladite activité étant inducible par liaison dudit récepteur ou dudit domaine de liaison du ligand avec undit ligand glucocorticoïde synthétique mais pas par liaison avec un ligand glucocorticoïde naturel lorsque ladite protéine se trouve fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand dudit récepteur.

Plus particulièrement la présente invention a pour objet un gène de fusion comprenant dans le sens 5' --> 3' :

- un fragment d'ADN codant pour la recombinase Cre du bactériophage P<sub>1</sub>;
- 5 - un fragment d'ADN codant pour tout ou partie de la région charnière D du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes, région située entre le domaine DBD et le domaine LBD, et
- le fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) modifié, notamment muté, du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes selon l'invention.

Et plus particulièrement encore, la présente invention a pour objet, un gène de fusion, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, une séquence codant pour la séquence d'acides aminés de l'IDS n° 2 comprenant :

- les acides aminés 1 à 343 qui correspondent à la recombinaison Cre ;
- les acides aminés 346 à 377 qui correspondent à la région C-terminale de la région D du récepteur humain des glucocorticoïdes ;
- les acides aminés 378 à 623 qui correspondent au LBD [GR(I747/T)].

Dans un mode de réalisation particulier, le gène de fusion a substantiellement pour séquence, la séquence Cre-LBD[GR(I747/T)] telle que représentée dans l'IDS n° 2 dont les acides aminés 626 à 667 correspondent à la région F du récepteur humain des oestrogènes.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression de la protéine de fusion codée par le gène de fusion selon l'invention, dans des cellules hôtes animales notamment de mammifères, caractérisé en ce qu'il comporte le gène de fusion selon l'invention, placé sous le contrôle d'éléments d'expression assurant son expression dans lesdites cellules hôtes. Le vecteur d'expression de la protéine de fusion peut également être un vecteur d'intégration dans le génome des cellules hôtes.

Dans les vecteurs selon l'invention, pour exprimer le récepteur, le LBD ou la protéine de fusion selon l'invention, il faut que les fragments d'ADN codant pour ces molécules soient placées sous le contrôle de

séquence de régulation, notamment des séquences promotrices/ enhancer. On peut utiliser en particulier des séquences promotrices/enhancer du virus SV<sub>40</sub>.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de  
5 recombinaison, notamment d'excision, insertion, inversion ou translocation conditionnelle au niveau d'un fragment d'ADN contenant un ou deux sites de reconnaissance spécifique d'une protéine recombinase dans des cellules hôtes humaines ou animales, notamment de mammifères, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes dans lesquelles :

10 1) on introduit une protéine de fusion selon l'invention ou un vecteur d'expression de ladite protéine de fusion selon l'invention dans lesdites cellules hôtes dans des conditions permettant l'expression de la protéine de fusion selon l'invention et,  
15 2) on complexe ladite protéine de fusion avec undit ligand glucocorticoïde synthétique, en mettant ledit ligand en présence desdites cellules hôtes.

La présente invention fournit donc un procédé de délétion conditionnelle d'un fragment d'ADN dans lequel on met en oeuvre un procédé d'excision selon l'invention, et dans lequel ledit fragment d'ADN à 20 exciser est intégré entre deux sites de reconnaissance de protéine recombinase orientés en répétition directe. En particulier, ledit fragment d'ADN peut être choisi de telle sorte que l'excision dudit fragment d'ADN a pour effet, l'inactivation dudit gène. L'excision dudit fragment d'ADN peut également permettre la synthèse d'une protéine fonctionnelle, si ledit fragment contient par exemple un codon stop ou un signal de 25 polyadenylation.

Dans le mode préféré de réalisation selon l'invention, lesdits sites de reconnaissance spécifique de la protéine recombinase sont les sites loxP et ladite protéine recombinase est la protéine Cre du bactériophage P<sub>1</sub>.

30 Ledit fragment d'ADN que l'on veut recombiner, notamment exciser et le ou lesdits sites de reconnaissance spécifiques d'une protéine recombinase peuvent être portés par un vecteur plasmidique ou viral, ou intégrés dans le chromosome des cellules hôtes.

L'intégration d'un gène portant des sites loxP dans un génome peut être aléatoire ou ciblée. En particulier, l'intégration des sites de reconnaissance spécifique de la protéine recombinase, notamment du ou des sites loxP pour la recombinase Cre, peut se faire par recombinaison homologue du gène comportant ledit fragment d'ADN à exciser ou inverser (2 sites loxP) ou respectivement insérer ou transloquer (1 site loxP) avec undit gène modifié comportant ledit fragment d'ADN à exciser flanqué en 5' et/ou 3' par le ou lesdits sites de reconnaissance de recombinase en fonction de l'application désirée, notamment les sites loxP.

On a construit une protéine chimérique, Cre-LBD[GR(I747/T)] de l'IDS n° 2, composée de la recombinase Cre fusionnée au LBD de GR (I747/T). La protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)] permet de réaliser une recombinaison entre des sites loxP, dans une cellule de mammifère, suite à un traitement par des glucocorticoïdes synthétiques. En l'absence de traitement, ou en présence de concentrations de glucocorticoïdes naturels allant jusqu'à  $10^{-6}$  M aucune excision n'est observée. Cette chimère est capable d'exciser les séquences d'ADN situées entre des sites loxP intégrés préalablement dans le génome de cellules F9 (embryocarcinome de souris) ou présents sur un plasmide après transfection de ces cellules avec un vecteur exprimant Cre-LBD[GR(I747/T)], suite à un traitement à la Dex à  $10^{-6}$  M ou  $10^{-7}$  M, alors qu'à de telles concentrations, le cortisol n'induit pas d'activité recombinase. Comme on l'a déjà mentionné, le vecteur d'expression de Cre-LBD[GR(I747/T)] peut également être un vecteur d'intégration dans le génome des cellules hôtes.

Ce système permet donc de libérer l'activité recombinase de protéine chimérique à un moment donné et choisi. La protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)] peut être exprimée dans des cellules contenant des sites loxP, sans modifier le locus contenant les sites loxP. La recombinaison au niveau des sites loxP a lieu uniquement après traitement aux glucocorticoïdes synthétiques. De plus en exprimant la protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)] dans un animal sous le contrôle d'un promoteur à spécificité cellulaire, on peut obtenir une recombinaison entre des sites loxP, spécifiquement dans ces cellules.

La présente invention a également pour objet un vecteur de transfert d'un fragment d'ADN dans des cellules hôtes humaines ou animales, notamment mammifères, caractérisé en ce qu'il comporte undit fragment d'ADN à transférer comprenant des sites de reconnaissance spécifiques de la recombinase, notamment deux sites loxP, orientés à répétitions directe et une cassette d'expression d'un gène de fusion selon l'invention. De façon appropriée les deux sites sont placés à chaque extrémité dudit fragment d'ADN.

De préférence, le gène de fusion est placé sous le contrôle 10 d'éléments d'expression spécifiques des cellules hôtes, en particulier, il comporte la séquence du plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)] de l'IDS n° 3.

Dans le procédé d'excision selon l'invention, ledit fragment d'ADN à exciser peut être transféré dans les cellules hôtes avant, en même temps, ou après l'étape d'introduction de la protéine de fusion ou d'un vecteur de 15 transfert.

Le vecteur de transfert selon l'invention peut être, un vecteur plasmidique ou un vecteur viral. Le mode de transfert varie en fonction du type de cellule cible et de l'efficacité recherchée.

Lorsque le matériel est transféré dans les cellules germinales, on 20 utilise de préférence la microinjection du pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé. Pour introduire l'ADN dans des cellules embryonnaires pluripotentes (cellules ES), la technique appropriée sera plutôt l'électroporation ou l'utilisation de vecteurs retroviraux

Pour des expériences portant sur les cellules somatiques, on 25 cherche à obtenir une efficacité maximale, d'où l'utilisation préférentielle de vecteurs viraux : rétrovirus et adenovirus, principalement. Ces virus doivent être défectifs, notamment pour une application en santé humaine pour empêcher toute multiplication et tout risque de réversion.

Après intégration ou non de ce type de vecteurs dans le génome, le 30 système Cre-lox permet d'exciser certaines séquences virales, qui pourraient éventuellement présenter un risque quant à la propagation ultérieure du virus. Ceci est très avantageux pour l'utilisation de tels vecteurs en thérapie génique. Des vecteurs contenant une cassette

d'expression du gène Cre-LBD[GR(I747/T)] et des sites lox encadrant un gène potentiellement "dangereux" et cette cassette permettent, le cas échéant après intégration dans le génome du virus recombiné, d'éliminer ces éléments. Inversement, on peut également activer un gène que l'on a intégré sous forme inactive. Cette activation peut résulter de la délétion d'un fragment dudit gène par exemple un codon stop ou un signal de polyadénylation encadré de sites loxP.

Lorsque l'on veut transférer du matériel génétique dans une cellule, on utilise en général des constructions comportant le gène à transférer, auquel on a adjoint éventuellement un gène auxiliaire, conférant un avantage sélectif (par exemple, le gène neo, conférant la résistance à l'antibiotique G418).

Les marqueurs de sélection peuvent également être excisés par le procédé d'excision selon l'invention.

En utilisant des techniques classiques, on peut modifier par recombinaison homologue des gènes de mammifères, notamment de souris. Un site loxP peut être introduit dans un gène qu'on veut modifier, ou deux sites loxP peuvent encadrer des séquences que l'on veut modifier. En particulier, le marqueur de sélection utilisé pour permettre d'identifier les événements de recombinaison homologue peut être gênant, et peut dans un premier temps être éliminé, si nécessaire, s'il est lui même encadré de sites de reconnaissance de recombinase tels que des sites loxP ou FRT, en microinjectant la protéine recombinase correspondante, en transfectant les cellules, notamment des cellules ES, avec un vecteur d'expression pour une protéine recombinase, ou en croisant des souris portant le marqueur de sélection avec des souris exprimant la recombinase désirée, notamment la recombinase Cre. Ceci permet d'obtenir des souris dont la seule modification au niveau du locus modifié est l'insertion de sites de reconnaissance tels que loxP. Ces souris peuvent par la suite être croisées avec des souris exprimant Cre-LBD[GR(I747/T)] et la modification du locus obtenue par traitement avec le ligand tel que la Dex. Ceci permet d'inactiver ou de modifier un gène à un moment déterminé, et donc d'étudier la fonction de ces gènes à différents moments du développement. Ceci est particulièrement intéressant pour l'étude des gènes qui sont

indispensables au bon déroulement du développement embryonnaire. En effet, dans certains cas, les techniques classiques de recombinaison homologue entraînent la mort de l'embryon et ne permettent pas d'étudier la fonction du gène à des stades plus tardifs.

5 Le transfert de gènes dans une cellule donnée est à la base de la thérapie génique. Les vecteurs les plus efficaces à cet égard sont des vecteurs viraux, en particulier rétroviraux ou adénoviraux (39). La présente invention a donc également pour objet un vecteur de transfert selon l'invention comportant ledit fragment d'ADN à transférer 10 comportant deux sites loxP orientés en répétition directe pour une utilisation comme médicament en thérapie génique, lorsque celui-ci est administré en combinaison avec undit ligand glucocorticoïde synthétique tel que la dexaméthasone.

15 Ce type de vecteur permet de transférer le fragment d'ADN désiré comportant deux sites de reconnaissance spécifique de recombinase dans un gène de sorte que les séquences d'ADN situées entre les deux sites loxP pourront être excisées de façon conditionnelle après administration dudit ligand glucocorticoïde synthétique.

20 La présente invention fournit en outre des cellules humaines ou animales notamment de mammifères, transfectées par un vecteur d'expression et de transfert d'une protéine de fusion selon l'invention, ou des cellules humaines ou animales notamment de mammifères, dans lesquelles un fragment d'ADN a été transféré à l'aide d'un vecteur de transfert selon l'invention, ou encore des cellules humaines ou animales, 25 notamment de mammifères exprimant de façon constitutive la protéine de fusion selon l'invention.

30 La présente invention a enfin pour objet supplémentaire, un animal transgénique, notamment une souris comportant un gène fonctionnel de la protéine de fusion selon l'invention, celui-ci étant notamment intégré dans un de ses chromosomes.

Ou encore un animal transgénique comportant un gène fonctionnel de la protéine de fusion selon l'invention, dans lequel un gène d'intérêt est modifié par insertion de site(s) loxP, notamment intégré(s) dans un ou plusieurs chromosomes.

La présente invention a enfin pour objet l'utilisation d'un vecteur d'expression ou de transfert de cellules ou d'un animal selon l'invention comme outil d'analyse ou d'étude du fonctionnement d'un gène donné d'une cellule hôte et une méthode de traitement de cellules ex vivo ou in vitro impliquant la mise en oeuvre d'un procédé d'excision, insertion, inversion ou translocation selon l'invention et l'utilisation d'un vecteur d'expression ou de transfert selon l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre.

L'IDS n° 1 représente les séquences nucléotidique et peptidique de GR(I747/T) avec le DBD correspondant aux aa 421-487 et le LBD correspondant aux aa 532-777;

L'IDS n° 2 représente les séquences nucléotidique et peptidique de Cre-LBD[GR(I747/T)]

Les nucléotides 1-1029 codent pour la recombinase Cre (aa 1-343).

Les nucléotides 1036-1131 codent pour la région C-terminale de la région D du récepteur humain des glucocorticoïdes [aa 500-531 de GR(I747/T) ; aa 346-377 de Cre-LBD[GR(I747/T)]].

Les nucléotides 1132-1869 codent pour le LBD de GR(I747/T) [aa 532-777 de GR(I747/T) ; aa 378-623 de Cre-LBD[GR(I747/T)]].

Les nucléotides 1876-2001 codent pour la région F du récepteur humain des oestrogènes [aa 554-595 de HEGO ; aa 626-667 de Cre-LBD[GR(I747/T)]].

Les nucléotides 1777-1779 correspondent à la mutation qui remplace l'isoleucine par une thréonine.

L'IDS n° 3 représente la séquence nucléotidique du plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)]

Les IDS n° 4 à 17 représentent les séquences nucléotidiques des différents oligonucléotides utilisés selon l'invention.

La Figure 1 est une représentation schématique d'activités recombinases de Cre.

La Figure 2 représente l'activité transcriptionnelle de récepteur GR mutant et de type sauvage en réponse à la dexaméthasone et la capacité de fixation de la dexaméthasone aux deux récepteurs.

La Figure 3 représente une analyse de Scatchard de la liaison de [<sup>3</sup>H]-dexaméthasone aux récepteurs de type sauvage et mutant I747/T.

La Figure 4 représente la compétition par RU 486 des activités de liaison de Dex et de transactivation du récepteur de type sauvage (TS) et GR(I747/T).

La Figure 5 est une représentation schématique des protéines Cre, hER, Cre-ER, hGR et Cre-LBD[GR(I747/T)].

La Figure 6 est une représentation schématique du plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)].

La Figure 7 représente la séquence nucléotidique de pCre-LBD[GR(I747/T)] et la séquence peptidique de Cre-LBD[GR(I747/T)].

La Figure 8 représente la stratégie PCR utilisée pour détecter les allèles sauvages, mutés et recombinés dans le test d'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)].

La Figure 9 représente l'analyse par PCR de l'excision des séquences situées entre les sites loxP après transfection transitoire de pCre-LBD[GR(I747/T)] dans les cellules murines RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL) sans ajout de ligand, ou traitées au cortisol (10<sup>-6</sup> M) ou à la dexaméthasone (10<sup>-6</sup> M).

La Figure 10 représente l'analyse par PCR de l'activité recombinase de Cre-GR(I747/T) dans les cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL) : Cre-GR(I747/T) non traitées ou traitées avec du cortisol ou de la dexaméthasone à 10<sup>-6</sup>M.

La Figure 11 récapitule l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] dans la lignée RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL) exprimant la recombinase de façon constitutive, en présence de concentrations croissantes de différents ligands.

La Figure 12 représente l'analyse par PCR de l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] induite par des ligands synthétiques malgré la présence de ligands naturels.

La Figure 13 représente le test de l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] dans les cellules humaines HeLa.

La Figure 14 est une représentation schématique du transgène Cre-LBD[GR(I747/T)]. La partie (a) représente le fragment d'ADN contenant la séquence codante du gène Cre-LBD[GR(I747/T)] utilisé pour établir des

souris transgéniques et la partie (b) représente la structure génomique de l'allèle RXR $\alpha$  de type sauvage, de l'allèle cible RXR $\alpha^{\Delta AF2(LNL)}$  et de l'allèle excisé RXR $\alpha^{\Delta AF2(L)}$  ainsi que la stratégie PCR pour l'analyse de l'excision du marqueur.

5 La Figure 15 représente l'analyse par PCR de l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] chez la souris traitée à la dexaméthasone.

**EXEMPLE 1** : Remplacement de l'isoleucine 747 par la thréonine dans le récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes.

10 On a obtenu un mutant GR humain comportant un seul remplacement d'acide aminé, celui du résidu isoleucine 747 par un résidu thréonine, localisé entre les hélices H11 et H12, dans la partie C-terminale du domaine de liaison du ligand. Cette mutation est apparue spontanément dans les vecteurs dérivés de HG1 (40). Ce mutant diffère des autres mutants  
15 de LBD de GR décrits précédemment (22, 38), dont la fonction d'activation altérée est en étroite corrélation avec une modification de leurs propriétés de liaison du ligand *in vitro*.

#### 1. Mutation dans le GR humain

Le vecteur d'expression du GR humain de type sauvage (pSG5HG0) a  
20 été obtenu en clonant le fragment BamHI d'environ 2.9 kb (contenant le cadre de lecture ouvert du hGR de type sauvage) isolé du vecteur HG0 précédemment décrit (40), dans le site BamHI du vecteur d'expression pSG5 (41).

Toutes les constructions d'ADN ont été effectuées au moyen de  
25 techniques classiques (42). Le vecteur d'expression GR (I747/T)hGR codant pour un mutant portant la mutation I 747->T, a été obtenu à partir du fragment de digestion PstI-PflMI du vecteur d'expression HG1 (40) muté qui était ligaturé dans les sites PstI et PflMI correspondants de pSG5HG0.

En plus de la mutation du résidu isoleucine 747 en un résidu thréonine présente dans HG1, ce mutant contient également une mutation du site EcoRI qui n'entraîne pas d'altération de la séquence peptidique.

La présence de la mutation a été confirmée par séquencage (protocole Sequenase 2.0, U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH).

## 2. Résultats

2.1. Le remplacement de l'isoleucine 747 par la thréonine conduit à un décalage de la courbe de réponse en fonction de la dose de dexaméthasone pour la transactivation, sans affecter sensiblement 5 l'affinité de liaison du ligand.

On a comparé les caractéristiques transcriptionnelles du hGR de type sauvage (TS) et d'un mutant dans lequel l'isoleucine 747 a été remplacée par la thréonine [désigné ci-après par GR(I747/T)]. Les récepteurs ont été exprimés transitoirement dans des cellules CV-1 10 exemptes de GR, conjointement avec un gène reporter de luciférase sous le contrôle du promoteur de l'aminotransférase de la tyrosine (pTAT-tk-Luc). La Figure 2 montre les courbes correspondantes de réponse en fonction de la dose de ligand utilisée, permettant de déterminer les valeurs de la CE<sub>50</sub> 15 (la concentration de ligand donnant 50 % de la réponse transcriptionnelle maximale). La courbe de réponse en fonction de la dose pour hGR TS présente une réponse maximale à  $10^{-8}$  M de Dex et une réponse égale à la moitié de la réponse maximale à  $4 \times 10^{-10}$  M, alors que la courbe de réponse transcriptionnelle du mutant GR(I747/T) est nettement décalée vers les 20 plus fortes concentrations de ligand, entraînant des valeurs 100 fois plus élevées de la CE<sub>50</sub> pour Dex ( $4 \times 10^{-8}$  M) (voir tableau I ci-après). La stimulation maximale médiée par GR(I747/T) a été atteinte à environ  $10^{-6}$  M Dex. Toutefois, il est important de noter que le récepteur GR(I747/T) 25 est capable d'activer la transcription du pTAT-tk-Luc au même degré que le GR TS. En conséquence, le remplacement du résidu isoleucine par la thréonine à la position 747 ne diminue pas l'aptitude du GR à activer la transcription mais a modifié spécifiquement la sensibilité au ligand de la réponse.

L'effet de cette mutation est indépendant de la région A/B N-terminale et de sa fonction de transactivation associée AF-1. Les mutants 30 de délétion dépourvus de AF-1 mais contenant la mutation I747/T[ΔA/B-GR(I747/T)] nécessitent  $3 \times 10^{-8}$  M de Dex pour une stimulation représentant la moitié de la stimulation maximale, tandis que seulement  $6 \times 10^{-10}$  M sont suffisants pour le ΔA/B-GR dérivé de TS (données non représentées; voir également le tableau II pour les chimères GAL

correspondantes). Ainsi, la mutation I747/T exerce un effet similaire sur le GR complet et le GR à délétion N-terminale. On peut en conclure que le décalage observé dans la réponse en fonction de la dose de ligand n'est pas la conséquence d'une interaction modifiée entre AF-1 et AF-2.

5 Pour déterminer l'effet de la mutation I747/T sur la liaison du ligand, on a mesuré la liaison de Dex dans un cytosol de cellules Cos-7 exprimant transitoirement le hGR mutant et le hGR de type sauvage. Les valeurs de  $K_d$  obtenues à partir d'une analyse de Scatchard sont très semblables, puisque le mutant I747/T ne manifeste qu'une affinité pour la  
10 Dex deux fois plus faible que le GR TS (Figure 3). Ainsi, l'ordre de grandeur du décalage des courbes dose-réponse vers les fortes concentrations de hGR (I747/T), par rapport au hGR TS (environ 100 fois) est peu susceptible de résulter d'une diminution d'affinité pour le ligand du hGR muté (facteur 2 seulement ; comparer les Figures 2 et 3).

15 2.2. hGR(I747/T) ne répond pas aux ligands naturels

Pour caractériser davantage les caractéristiques de liaison du mutant I747/T, on en a comparé l'activation par divers agonistes synthétiques connus pour le GR TS (triamcinolone acétonide, RU28362, bimédrazol), un agoniste partiel (fluocinolone acétonide) et des  
20 glucocorticoïdes naturels (cortisol, cortico-stérone). Avec le récepteur mutant, le triamcinolone acétonide et le RU28362 donnent la même transactivation qu'avec le récepteur de type sauvage, tandis que le bimédrazol et la fluocinolone acétonide ont manifesté une plus forte activité (tableau I). Pour tous ces analogues, le mutant I747/T manifeste un  
25 décalage de la courbe de réponse en fonction de la dose, en direction des plus fortes concentrations de ligand, bien que ce décalage soit moins prononcé pour des ligands à forte affinité (tableau I).

Les ligands naturels, tels que le cortisol ou la corticostérone ou l'aldostérone, le ligand naturel du récepteur de minéralocorticoïdes, se  
30 lient au GR avec une plus faible affinité que Dex. Avec le GR de type sauvage, ces ligands sont aussi efficaces que la Dex pour stimuler le reporter de la luciférase (tableau I). Toutefois, en présence de ces ligands naturels, et en contraste notable avec les effets observés avec Dex, la transactivation par le mutant I747/T est fortement diminuée (cortisol) ou  
35 supprimée (corticostérone, aldostérone).

2.3. Activités agonistes et antagonistes similaires de RU486 avec hGR de type sauvage et hGR mutant

RU486 est un puissant inhibiteur de l'expression des gènes dépendant des glucocorticoïdes. En présence de cet antagoniste, la fonction AF-2 de GR est bloquée, mais on a pu observer une certaine activité agoniste dépendant de AF-1 [(43) et références qui y sont contenues]. Une mutation ou une délétion de la partie C-terminale du LBD peuvent altérer la réponse à des ligands agonistes/antagonistes, bien que les rôles de AF-1 et de AF-2 n'aient pas été clairement définis dans les études rapportées (44-46).

Pour tester l'affinité de liaison relative de RU486 pour le mutant I747/T et le type sauvage, on a examiné l'aptitude de RU486 à entrer en compétition avec la Dex pour la liaison aux récepteurs. Des cellules transfectées avec hGR mutant ou TS ont été traitées par 10 nM de [<sup>3</sup>H]-Dex, une concentration suffisante pour engendrer essentiellement des récepteurs mutants et TS complexés avec la Dex, conformément aux essais de liaison de ligand in vitro (voir plus haut), et par des concentrations croissantes de RU486 (Figure 4). On a obtenu des valeurs de la  $\text{IC}_{50}$  (la concentration d'antagoniste bloquant 50 % de la transactivation maximale) très similaires pour les deux récepteurs ( $10^{-8}\text{M}$  pour le hGR TS et  $6 \times 10^{-9}\text{M}$  pour le hGR mutant). Ces résultats sont en accord avec les essais de liaison à Dex et montrent que les affinités de liaison à Dex et RU486 ne sont pas modifiées par la mutation I747/T.

2.4. Le décalage de l'activité transcriptionnelle du récepteur mutant est indépendant du promoteur

On a obtenu les résultats décrits ci-dessus dans des cellules transfectées, en utilisant un gène rapporteur contenant un fragment promoteur du gène TAT qui héberge deux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). Pour distinguer entre une modification des propriétés intrinsèques de transactivation du récepteur et une modification de l'activité coopératrice résultant de la liaison de plusieurs molécules de récepteur, on a comparé les activités transcriptionnelles du récepteur mutant GR(I747/T) et du récepteur de type sauvage, en utilisant un promoteur synthétique contenant un seul GRE, palindromique et

parfait. Les courbes correspondantes de réponse en fonction de la dose présentent les mêmes profils que celles obtenues avec le promoteur TAT. La réponse correspondant à la moitié de la réponse maximale est obtenue à  $10^{-10}$  M pour le GR TS et à  $2 \times 10^{-8}$  M pour GR(I747/T) (tableau II). Cela 5 indique que le décalage observé avec le récepteur mutant reflète les propriétés de transactivation intrinsèques du mutant GR(I747/T) et ne sont pas le résultat d'une altération de la coopération entre les récepteurs.

Le remplacement du domaine de liaison d'ADN de GR par les 147 premiers acides aminés du transactivateur de Gal4 de levure donne une 10 protéine activatrice hybride ayant une nouvelle spécificité de promoteur. Les hybrides Gal4-GR consistent en le domaine de liaison d'ADN (DBD) de Gal4 (1-147) fusionné avec le LBD de hGR TS ou mutant. Leurs aptitudes à activer la transcription ont été testées dans des essais de transfection transitoires dans des cellules HeLa. On a constaté le même décalage qu'avec 15 le mutant GR(I747/T) complet (tableau II). Ces résultats montrent que le décalage de la réponse transcriptionnelle en fonction de la dose du ligand est indépendant de promoteur et d'élément de réponse (RE). En outre, cet effet est apparemment non spécifique des souches de cellules utilisées, comme on l'a constaté à la fois dans des cellules humaines HeLa et des 20 cellules simiennes Cos. Pour exclure davantage une implication possible de facteurs se liant au promoteur tk ou  $\beta$ -globine du gène rapporteur (47), on a utilisé un gène rapporteur contenant un élément de réponse Gal4 précédant un promoteur minimal. Bien que la transactivation par la 25 protéine chimérique Gal4 ait été diminuée avec ce gène rapporteur minimal, on a encore pu observer un décalage de la courbe de réponse vers les doses croissantes pour la protéine chimérique mutante Gal4-GR(I747/T) (tableau II).

## 2.5. Activité transcriptionnelle de récepteurs GR mutant et de type sauvage en réponse à la dexaméthasone (Figure 2).

30 Des cellules CV-1 ont été transitoirement transfectées avec 0,5  $\mu$ g de vecteurs d'expression de GR de type sauvage (□) ou de GR(I747T) (○), 2,5  $\mu$ g de pTAT-tk-Luc en tant que plasmide rapporteur et 0,5  $\mu$ g de pCMV- $\beta$ Gal en tant que témoin interne. Après la transfection, on a mis les cellules à

incuber pendant 24 heures avec des concentrations croissantes de Dex, et on les a ensuite soumises à un essai des activités  $\beta$ -galactosidase et luciférase, comme décrit dans "Matériels et Méthodes". L'activité luciférase a été normalisée avec l'activité  $\beta$ -galactosidase, et la valeur obtenue en absence de ligand a été soustraite pour chaque point. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'activité luciférase maximale obtenue pour chaque récepteur. Chaque point est la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne, de quatre déterminations séparées effectuées en double. Les analyses de liaison à saturation ont été effectuées avec des cytosols provenant de cellules Cos-7 transfectées avec 40  $\mu$ g de vecteur d'expression de hGR de type sauvage (□) ou de hGR(I747/T) (●), avec 20  $\mu$ g de pCMV- $\beta$ Gal mis à incuber pendant une nuit à 4°C en présence de concentrations croissantes de [ $^3$ H]-dexaméthasone  $\pm$  un excès de 100x de Dex radio-inerte. Le stéroïde [ $^3$ H] fixé a été mesuré après traitement au charbon enrobé de dextran. Les résultats représentés sont ceux d'un seul essai effectué en double et représentatif de trois essais séparés. Les courbes de saturation de la liaison de [ $^3$ H]-dexaméthasone sont représentées en pourcentage de la capacité de liaison maximale obtenue pour chaque récepteur. La capacité de liaison du mutant GR(I747/T) est diminuée pour atteindre environ 40-60 % de celle du hGR de type sauvage ( $623 \pm 65$  fmoles/mg de protéine, par rapport à  $1\ 340 \pm 285$  fmoles/mg de protéine).

2.6. Analyse de Scatchard de la liaison de [ $^3$ H] -dexaméthasone aux récepteurs de type sauvage et mutant I747/T (Figure 3).

On a appliqué l'analyse de Scatchard à la liaison effectuée comme décrit sur la Figure 2. La constante de dissociation apparente du mutant GR(I747/T) (○) n'est que deux fois plus élevée que celle du hGR de type sauvage (□) ( $K_d = 5,1 \pm 1,9$  par rapport à  $2,7 \pm 1,3$  nM).

2.7. Tableau I

Activités transcriptionnelles et  $EC_{50}$  de divers stéroïdes avec hGR de type sauvage et hGR(I747/T)

5

Ligand	Activité luciférase %		$EC_{50}$		
	Type	hGR	Type	hGR	% $EC_{50}$
	sauvage	(I747/T)	sauvage	(I747/T)	
Dexaméthasone	100	100	$4 \times 10^{-10} M$	$4 \times 10^{-8} M$	100
TA	98	102	$5 \times 10^{-10} M$	$2 \times 10^{-8} M$	40
RU28362	90	88	$3 \times 10^{-10} M$	$7 \times 10^{-9} M$	23
Fluocinolone	75	100	$1,5 \times 10^{-10} M$	$3 \times 10^{-9} M$	20
Bimédrazol	100	180	$10^{-10} M$	$2 \times 10^{-9} M$	20
Cortisol	110	15	$7 \times 10^{-9} M$	nm	
Corticostérone	100	0	$7 \times 10^{-8} M$	nm	
Aldostérone	90	0	$5 \times 10^{-8} M$	nm	

20 Les co-transfections ont été effectuées et les courbes de réponse en fonction de la dose ont été construites comme décrit sur la Figure 2. On a testé à six concentrations croissantes, en double, le triamcinolone acétonide (TA), RU28362, le fluocinolone acétonide (fluocinolone), le cortisol, la corticostérone et l'aldostérone. Les essais de l'activité luciférase et de la  $\beta$ -galactosidase ont été effectués comme décrit dans "Matériels et Méthodes". Les moyennes de trois essais indépendants sont données dans ce tableau. nm = non mesurable.

25 2.8. Compétition des activités de liaison de Dex et de transactivation par RU486 (Figure 4).

30 Des cellules Cos-7 transfectées avec le hGR de type sauvage (0) ou mutant I747T (•) ont été mises à incuber pendant 1 heure à 37°C avec de la [ $^3H$ ]-dexaméthasone 10 nM seule ou en présence de la concentration indiquée de RU486 non marqué, comme décrit dans "Matériels et

Méthodes". Les données sont exprimées en pourcentage de la liaison spécifique observée sur le témoin non soumis à la compétition. Ces données représentent la moyenne de déterminations effectuées en double pour chaque concentration d'antagoniste.

5 L'activité antagoniste a été déterminée sur des cellules CV-1 transfectées comme décrit sur la Figure 4 et traitées simultanément par Dex  $10^{-7}$ M et la concentration indiquée de RU486, 24 heures avant la récolte pour l'essai des activités luciférase et  $\beta$ -galactosidase. 100 % d'activité sont définis pour chaque récepteur comme l'activité luciférase des cellules 10 traitées par la Dex seule. Chaque point représente la moyenne d'au moins deux essais indépendants effectués en double. (□): hGR de type sauvage; (○): mutant I747T.

### 2.9. Tableau II

15 CE<sub>50</sub> obtenue avec divers gènes reporter

	Récepteur	Gène rapporteur	CE <sub>50</sub>
	GR de type sauvage	pGRE-tk-Luc	$10^{-10}$ M
20	GR(I747/T)	"	$2 \times 10^{-8}$ M
	Gal4-GR	p(17M) <sub>5</sub> - $\beta$ Glob-Luc	$1,7 \times 10^{-9}$ M
	Gal4-GR <sub>(I747/T)</sub>	"	$1,5 \times 10^{-7}$ M
	Gal4-GR	p(17M) <sub>5</sub> -tata-Luc	$2 \times 10^{-9}$ M
	Gal4-GR <sub>(I747/T)</sub>	"	$2 \times 10^{-7}$ M

25

Des cellules HeLa (pour les chimères Gal4) ou des cellules CV-1 ont été cotransférées transitoirement avec divers vecteurs d'expression et gènes reporter. L'efficacité de la transfection a été standardisée en cotransférant par 0,5  $\mu$ g de vecteur pCMV- $\beta$ gal. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures par des concentrations croissantes de dexaméthasone. Les essais de la luciférase et de la  $\beta$ -galactosidase ont été effectués comme décrit dans "Matériels et Méthodes". L'activité luciférase est exprimée en pourcentage de l'activité maximale obtenue pour chaque récepteur et chaque gène reporter. Les valeurs de la CE<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement.

## 2.10. Récapitulatif

La mutation de l'isoleucine 747 du récepteur humain des glucocorticoïdes en thréonine résulte en une très forte diminution, voire une abolition de l'activité de transactivation du récepteur, en présence de glucocorticoïdes naturels, alors qu'à des concentrations similaires, des glucocorticoïdes synthétiques stimulent de façon efficace l'activité de transactivation de ce récepteur muté.

Il est important de souligner que hGR(I747/T) répond totalement à une forte concentration de Dex, ce qui indique qu'il peut en principe transactiver aussi efficacement que sa contrepartie de type sauvage. En conséquence, la fonction d'activation transcriptionnelle de AF-2 elle-même n'est apparemment pas altérée par la mutation, comme c'est le cas pour des récepteurs comportant des mutations dans la partie centrale de AF-2 (voir l'introduction pour les références).

## 15 3. Matériels et méthodes

### 3.1. Cultures cellulaires et transfection

Les cellules CV-1 et Cos-7 ont été cultivées dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco, Grand Island, NY), dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules HeLa ont été cultivées dans les mêmes conditions. Les transfactions transitoires ont été effectuées dans des multi-plaques à 6 trous, selon le mode opératoire au phosphate de calcium déjà décrit (42). Un plasmide recombinant de référence, pCMV-βGal, exprimant la β-galactosidase bactérienne, a été transfété conjointement avec le vecteur d'expression du récepteur et le gène reporter correspondant, afin de corriger d'éventuelles variations de l'efficacité de la transfection. Le précipité a été éliminé par lavage au bout de 24 heures, et les cellules ont été maintenues dans du DMEM sans SVF mais contenant de l'hormone. Au bout d'encore 24 heures, les cellules ont été rincées et lysées pendant 15 minutes avec 0,3 ml de tampon de lysate [Tris.phosphate 25mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, 1% de Triton X100, 10 % de glycérol (48)]. L'activité luciférase correspondante a été déterminée sur une fraction aliquote (0,1 ml), par évaluation du pic de luminescence (pour un temps d'intégration de 15 secondes), après injection de 0,1 ml de luciférine 1 mM

dans un luminomètre LKB. La  $\beta$ -galactosidase a été déterminée par la méthode modifiée par Bocquel et al. (49), pour le contrôle de l'efficacité de chaque transfection.

### 3.2. Plasmides utilisés

5 Les GR à délétion N-terminale,  $\Delta A/B$ -GR ou  $\Delta A/B$ -GR5I747/T), qui exprimaient seulement les acides aminés 368 à 777, ont été obtenus à partir du fragment de digestion *Pst*I-*Pfl*MI du vecteur d'expression HG0 ou pGR(I747/T), respectivement, ligaturé dans les sites correspondants de HG8 (49). Le plasmide pGAL-GR (don de T. Lerouge) était constitué du domaine 10 de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 de levure (aa1-147) et du domaine de liaison à une hormone de GR (a500-777); pGal-GR(I747/T) a été construit par insertion de la mutation dans pGal-GR.

Le gène reporter pTAT-tk-Luc a été fourni par D. Gagne et a été construit comme suit: on a d'abord engendré un plasmide intermédiaire 15 pTAT, par insertion du segment EcoRI-BamHI de 966 pb, provenant de pKT531 [fourni gracieusement par T. Grande (50)] dans les sites correspondants du vecteur pUC19 (Pharmacia). Le fragment contenant la séquence codant pour la luciférase de luciole et le promoteur minimal thymidine kinase (tk) provenant du virus Herpes simplex a été isolé sous 20 forme d'un fragment BamHI à partir de pvit-tk-Luc (51) et inséré, en aval du promoteur TAT, dans le site correspondant de pTAT. Le plasmide reporter pGRE-tk-Luc a été construit par ligature du fragment de digestion HindIII-BglII de pGRE-tk-CAT (52), qui contient un GRE synthétique (AGAACACagTGTTCT) en amont du promoteur minimal tk, dans les sites 25 HindIII-BglII de pLuc (53). Le gène reporteur p(17M)<sub>5</sub>- $\beta$ Glob-Luc a été décrit précédemment (54). Le plasmide reporter p(17M)<sub>5</sub>-tata-Luc a été construit à partir du plasmide p(17M)<sub>5</sub>-tata-CAT (55) par digestion par Xhol-BamHI et isolement du fragment contenant (17M<sub>5</sub>)-tata. Ce fragment 30 a été ensuite inséré dans le vecteur pGL<sub>2</sub> (Promega) digéré par les mêmes enzymes de restriction.

Le vecteur d'expression de la  $\beta$ -galactosidase pCMV- $\beta$ Gal contient la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase, sous contrôle du puissant promoteur constitutif de cytomégalovirus (CMV).

### 3.3. Essai de liaison à une hormone

Des cellules Cos-7 transfectées avec pCMV- $\beta$ Gal et hGR de type sauvage ou mutant I747/T ont été récoltées 48 heures après la transfection, dans une solution salée tamponnée au phosphate (STP), par grattage à l'aide d'une spatule en caoutchouc. Les cellules ont été lavées deux fois dans de la STP glacée. Toutes les étapes de la préparation de cytosols ont été effectuées à 4°C. On a remis les cellules en suspension dans 3 volumes de tampon de liaison [Na-HEPES 20 mM, pH 7,3, molybdate de sodium 20 mM et EDTA 5 mM (22)] et avec des inhibiteurs de protéase [leucopeptine (5 µg/ml), aprotinine (5 µg/ml), PMSF (40 µg/ml) et pepstatine A (5 µg/ml)], et on les a placées pendant 15 minutes sur de la glace. Les cellules ont ensuite été lysées par 30-40 coups de piston dans un homogénéisateur en verre Dounce, et l'homogénat résultant a été ensuite centrifugé à 110 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant, dénommé cytosol, a été utilisé immédiatement pour l'essai de liaison à une hormone. Les concentrations de protéine ont été déterminées par le dosage de protéine Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Pour l'essai de liaison à une hormone, on a mis à incuber pendant une nuit à 4°C un cytosol, contenant 1-3 mg de protéine/ml, avec de la [<sup>3</sup>H]-Dex (49 Ci/mmole; Radiochemical Center, Amersham, Angleterre) ou du cortisol (67 Ci/mmole; Radiochemical Center, Amersham, Angleterre) sans (liaison totale) ou avec (liaison non spécifique) un excès de 100 fois de composé radio-inerte (10<sup>-5</sup> M, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA). On a ensuite traité les échantillons par 1 volume de charbon-dextran (5% de charbon, 0,5% de dextran dans la solution de liaison) pendant 15 minutes dans de la glace, sous agitation constante, puis on les a soumis à une centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 g. Le ligand [<sup>3</sup>H] fixé a été mesuré dans une partie aliquote du surnageant, par comptage de scintillation. La constante de dissociation à l'équilibre (Kd) du récepteur pour la dexaméthasone ou le cortisol a été déterminée par analyse de Scatchard.

Pour l'analyse de liaison compétitive, on a mis les cytosols à incuber avec 10 nM de [<sup>3</sup>H]-Dex et diverses concentrations de stéroïdes compétitifs non radioactifs, dans les mêmes conditions que précédemment. Après

traitement au charbon-dextran et comptage de scintillation, la liaison spécifique a été exprimée en pourcentage du témoin non soumis à une compétition, et portée en fonction de la concentration du stéroïde en compétition. Des essais de liaison compétitive dans des cellules entières ont été effectués sur  $10^6$  cellules mises à incuber pendant 1 heure à 37°C avec 10 nM de [ $^3$ H]-Dex et diverses concentrations de stéroïdes en compétition. Après sonication dans 1 ml de tampon KCl (EDTA 1,5 mM, Tris.HCl 20 mM, pH 7,4, KCl 0,5 M), on a éliminé le stéroïde non lié par addition de deux volumes de charbon enrobé de dextran, dans du tampon KCl à la gélatine (0,05 % de dextran, 0,5% de charbon, 0,1% de gélatine). On a mis le mélange à incuber pendant 30 minutes à 4°C et on l'a centrifugé à 3 000 g pendant 5 minutes. La radioactivité a été déterminée par comptage de scintillation en liquide et on a porté sur une courbe comme précédemment la liaison spécifique.

15

**EXEMPLE 2 :** Recombinase Cre chimérique dont l'activité est inducible par des glucocorticoïdes synthétiques, mais pas par des glucocorticoïdes naturels

1. Matériel et méthodes

20

1.1. Construction du vecteur pCre-LBD[GR(I747/T)]

Un fragment d'ADN Clal-XbaI d'environ 1300 paires de base (pb), contenant la séquence codant pour le domaine de liaison du ligand du récepteur humain des glucocorticoïdes a été isolé du plasmide HG1 (voir Exemple 1 (40)) et ses extrémités ont été remplies par la T4 polymérase. Ce fragment a été muté de sorte que les nucléotides ATT codant pour une isoleucine en position 747 du récepteur sauvage (56) sont remplacés par les nucléotides ACC, codant pour une thréonine. Ce fragment muté a été cloné dans le vecteur pCre-ER (28) digéré par Xhol et PstI, dont les extrémités ont également été remplies par la T4 polymérase [plasmide pCre+GR(I747/T)+F; séquence codante du LBD de hGR(I747/T) dans la même orientation que celle de Cre]. pCre-LBD[GR(I747/T)] a été obtenu par mutagénèse dirigée réalisée sur l'ADN simple brin préparé à partir du plasmide pCre + GR(I747/T) + F, avec les oligonucléotides de synthèse :

30

- SG52 (5'-CTGGAAAGATGGCGATCTCGAGATTCAAGCAGGCCACT-3')

35

- SG53 (5' -CTGTTTCATCAAAAGGGTACCAAGCCGTGGAGGGGCAT- 3')

permettant de fusionner d'une part la séquence d'ADN codant pour la Cre [amino acides (aa) 1-343 (orf2 (cre) ; (31)], et celle qui code pour la région contenant le LBD muté de HG1 [aa 500-777], d'autre part la séquence d'ADN précédemment modifiée et celle codant pour la région F du récepteur humain des oestrogènes (ER) [aa 553-595 (57)] (Figure 5). Cette opération restaure le site de restriction Xhol situé à la fin des séquences Cre dans pCre-ER et introduit un site de restriction Kpnl entre les séquences codant pour GR et la région F du ER (Figures 6 et 7).

### 1.2. Mutation du gène RXR $\alpha$

Le vecteur (pRXR $\alpha$ (LNL)), utilisé pour muter le gène RXR $\alpha$  (58) par recombinaison homologue dans les cellules F9 a été construit de la façon suivante :

Un phage  $\lambda$  contenant un fragment génomique de 11.8 kb, comprenant les exons 2,3 et 4 de RXR $\alpha$ , a été isolé à partir d'une banque génomique réalisée avec de l'ADN génomique de l'embryocarcinome murin P19, cloné dans le vecteur  $\lambda$  EMBL3. Un fragment Sall isolé de ce phage (dont les extrémités ont été remplies par la T4 polymérase) a été sous cloné dans le site BamHI (après traitement à la T4 polymérase) d'un dérivé du vecteur pBluescriptIISK+ (Stratagène). Dans ce dérivé, le site Xhol a été supprimé. Un site Xhol a été introduit dans l'exon 4 de RXR $\alpha$  au niveau du site AccI correspondant au nucléotide 535 de l'ADNc de RXR $\alpha$  (la séquence de l'ADNc de RXR $\alpha$  est donnée dans Genbank référence : M 84817), en clonant dans le site AccI les oligonucléotides synthétiques suivants :

- 5'-ATTATTATTACTCGAGTGATGATG-3' et,
- 5'-ATCATCATCCGAGTAATAATA-3'.

Enfin, le fragment Xhol, contenant la cassette d'expression du gène de résistance à la néomycine, entourée de sites loxP, isolé du vecteur pHRS6 (28) a été cloné dans le site Xhol du vecteur précédent.

La mutation d'un allèle du gène RXR $\alpha$  dans des cellules F9 a été effectuée par recombinaison homologue à l'aide du vecteur pRXR $\alpha$ (LNL) (28). Cette lignée a été appelée RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL).

### 1.3. Expression de Cre-LBD[GR(I747/T)] dans des cellules comportant un fragment d'ADN modifié : RXR $\alpha$ (LNL)

- Transfection transitoire : 5. 10<sup>6</sup> cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL) ou cellules HeLa resuspendues dans 500  $\mu$ l de PBS ont été électroporées avec 5  $\mu$ g de plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)] [éventuellement cotransférées avec 5  $\mu$ g du vecteur pRXR $\alpha$ (LNL) pour les cellules Hela] à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad gene pulser), réglé à 200 V et 960  $\mu$ F. Les cellules ont ensuite été ensemencées à 10<sup>6</sup> cellules par boîte de 100 mm et traitées, si nécessaire, avec des ligands.

- Transfection stable : 5. 10<sup>6</sup> cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL), resuspendues dans 500  $\mu$ l de PBS ont été électroporées avec 5  $\mu$ g de pCre-LBD[GR(I747/T)] et 10 1  $\mu$ g de pPGK-Hyg (59), digérés respectivement par Sall et Pvull, à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad gene pulser), réglé à 200 V et 960  $\mu$ F. Les clones résistants ont été obtenus selon la procédure décrite par Metzger et al. (28).

#### 1.4. Amplification par "PCR" d'une région d'ADN génomique localisée dans l'exon 4 de RXR $\alpha$

Les amplifications d'ADN ont été réalisées en utilisant la technique de "Polymérase Chain Reaction" (PCR), selon le protocole décrit par Chen and Evans (60). Les amores utilisées sont : SB211 et PZ105, ayant respectivement comme séquence nucléotidique 5'-GGCAAACACTATGG-3' et 20 5'-TTGCGTACTGTCCTCTT-3'. Après dénaturation pendant 8 min à 94°C, 2,5 unités de Taq polymérase sont ajoutées. L'amplification est effectuée en réalisant 35 cycles (30 sec. à 94°C, 30 sec. à 50°C) suivi d'un cycle (30 sec. à 94°C, 30 sec. à 50°C, 5 min à 72°C) dont le produit est conservé à 4°C.

Les produits des réactions ont été séparés sur gel de polyacrylamide 25 (10 %) ou d'agarose (2,5%). L'ADN a été visualisé par UV suite à une coloration au bromure d'éthidium, ou par Southern Blot (42).

#### 1.5. Test d'excision des séquences situées entre les sites LoxP

L'ADN de cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL), transférées avec pCre-LBD[GR(I747/T)] ou le vecteur parental pSG5, non traitées ou traitées avec 30 du cortisol (10<sup>-6</sup>M) ou de la dexaméthasone (10<sup>-6</sup>M) pendant 72 heures, a été soumis à une réaction PCR selon la stratégie décrite en Figure 8. Les produits de la réaction ont été séparés sur gel d'acrylamide et colorés au bromure d'éthidium. La piste M sur la Figure 9 correspond au dépôt du marqueur de taille pBR322 digéré par Hinfl. La position des allèles sauvage 35 et recombiné est indiquée.

1.6. Analyse par PCR de l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] dans la lignée RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL) exprimant la protéine chimérique de façon constitutive.

Pour la Figure 10, l'ADN préparé à partir de cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL):Cre-GR(I747/T) non traitées ou traitées au cortisol ( $10^{-6}$ M) ou à la dexamethasone ( $10^{-6}$ M) a servi de matrice pour réaliser une amplification par PCR, selon la procédure décrite en Figure 8. L'ADN amplifié a été séparé sur gel d'acrylamide et coloré au bromure d'ethidium. Les pistes 1, 2, 3 et 4 contiennent respectivement les produits de PCR réalisés avec de l'ADN extrait de cellules F9 sauvages (WT), RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL), RXR $\alpha^{+/-}$ (L) et de C2RXR $\alpha^{-(L)/-(L)}$  (73). La piste 8 contient un marqueur de taille (échelle de 1kb ; GibcoBRL).

Sur la Figure 11, l'ADN préparé à partir de cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL):Cre-GR(I747/T) non traitées ou traitées avec de l'aldostérone, du cortisol, de la corticostérone, de la dexamethasone, de la triamcinolone acetonide ou du RU486, à des concentrations allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$ M, a servi de matrice pour réaliser une amplification par PCR, selon la procédure décrite en Figure 8. L'ADN amplifié a été séparé sur gel d'agarose et analysé selon la technique de Southern. Les fragments amplifiés correspondant aux allèles sauvage et recombiné ont été détectés par hybridation à l'aide de l'oligonucléotide de synthèse (5'-AAGAACGCCCTTGCAGCCCTC-3'), radiomarqué à l'extrémité 5' par de la T4 polynucléotide kinase. Le signal a été visualisé et quantifié à l'aide d'un "phospho-imager" (Fujix bas2000).

Pour la Figure 12, des cellules RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL):Cre-GR(I747/T) ont été cultivées pendant 72 h dans du milieu de culture auquel ont été ajoutés trois ligands naturels (l'aldostérone, le cortisol et la corticostérone) à la concentration de  $10^{-9}$  M ou  $10^{-8}$  M et de la dexaméthasone ( $10^{-7}$  ou  $10^{-6}$  M) comme indiqué. L'allèle recombiné a été détecté selon la procédure décrite en Figure 8. L'ADN amplifié a été séparé sur gel d'agarose et analysé selon la technique Southern. Les fragments amplifiés correspondant à l'allèle recombiné ont été détectés par autoradiographie, suite à une hybridation avec l'oligonucléotide de synthèse 5'-AATTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTC - 3', (contenant un site loxP) radiomarqué au Phosphore 32 à l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase.

Pour la Figure 13, des cellules HeLa ont été cotransférées par les plasmides pRXR $\alpha$ (LNL) et pCre-LBD[GR(I747/T)], puis cultivées pendant 72 heures avec ou sans addition des ligands indiqués, à la concentration de 10<sup>-7</sup>M. L'ADN de ces cellules a ensuite été soumis à une amplification PCR 5 selon la stratégie décrite. Les produits de la réaction ont été séparés sur gel d'acrylamide et colorés au bromure d'éthidium. La piste 1 correspond au dépôt du marqueur de taille 1 kb ladder (échelle de 1kb, GibcoBRL).

## 2. Résultats

Afin d'exprimer une recombinase Cre dont l'activité soit inducible 10 par des ligands synthétiques du récepteur des glucocorticoïdes, mais non par des ligands glucocorticoïdes naturels aux concentrations "physiologiques", on a construit un vecteur d'expression, pCre-LBD[GR(I747/T)], dérivé du vecteur pCre-ER (28) en remplaçant la 15 séquence d'ADN codant pour les acides aminés 344-618 contenant le LBD du récepteur des oestrogènes (RE), par celle codant pour les acides aminés 500-777 d'un récepteur des glucocorticoïdes (GR) muté contenant le domaine de liaison (LBD) muté du GR(I747/T). La construction de ce 20 plasmide a conduit à l'insertion de la séquence GGTACC, codant pour les aa Gly-Thr en position 624-625 de Cre-LBD[GR(I747/T)] (Figure 7).

L'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] a été testée dans une lignée cellulaire murine RXR $\alpha^{+/-}$ (LNL). Cette lignée a été obtenue en intégrant par recombinaison homologue le gène TK-neo, encadré de sites loxP (en répétition directe) (LNL), dans l'exon 4 d'un allèle du gène RXR $\alpha$  (28). Le gène TK-neo est un gène chimérique permettant l'expression 25 d'une protéine de fusion thymidine kinase/gène de résistance à la néomycine. L'électroporation de cette lignée avec le vecteur pCre-LBD[GR(I747/T)] a permis d'évaluer son activité recombinase sans ajout de ligand, ou après addition de cortisol (ligand naturel) ou de dexamethasone (Figure 9) (Dex ; ligand synthétique). L'ADN des cellules ainsi traitées est 30 en effet soumis à une PCR avec des oligonucléotides synthétiques localisés dans l'exon 4, l'un en amont du site Accl, l'autre en aval de ce site. La taille des fragments PCR obtenus avec cette paire d'oligonucléotides, est de 65 pb pour l'allèle sauvage, de 3345 pb pour l'allèle muté (après intégration de LNL) et de 191 pb pour l'allèle recombiné (après excision des séquences

situées entre les deux sites lox et d'un des sites lox, voir figure 8). Suite à un traitement des cellules transfectées à la dexaméthasone ( $10^{-6}$  M), un fragment de 191 pb est observé, reflétant la présence de séquences correspondant à l'allèle recombiné, alors qu'en l'absence de traitement ou suite à un traitement au cortisol ( $10^{-6}$  M), aucun fragment de cette taille n'est observé. Ces résultats montrent donc que l'activité recombinase de la protéine de fusion étudiée peut être induite en traitant des cellules exprimant cette protéine avec un ligand synthétique du GR tel que la dexamethasone mais pas avec un ligand naturel tel que le cortisol, à la concentration de  $10^{-6}$  M.

On a également établi une lignée  $\text{RXR}\alpha^{+/-}(\text{LNL})$  exprimant de façon constitutive Cre-LBD[GR(I747/T)], en cointégrant la cassette d'expression du gène Cre-LBD[GR(I747/T)] avec un vecteur exprimant le gène de résistance à l'hygromycine ( $\text{RXR}\alpha^{+/-}(\text{LNL})$  : Cre-GR(I747/T) ; voir "Matériel et Méthodes" ; données non présentées). L'activité recombinase a été testée suite à un traitement de ces cellules avec de la Dex ( $10^{-6}$  M) pendant 72 heures. L'analyse des produits des PCR effectuées sur l'ADN de ces cellules révèle un fragment de 191 pb correspondant à l'allèle recombiné uniquement après traitement à la Dex (Figure 10).

Ainsi, il est montré que Cre-LBD[GR(I747/T)] est inactive sans ajout de ligand ou en présence de cortisol à  $10^{-6}$  M, mais active en présence de Dex, lorsque sa cassette d'expression est intégrée dans le génome.

On a également évalué la cinétique d'action de la recombinase : son activité est détectable dès 12h de traitement à la dexaméthasone à  $10^{-6}$  M, mais elle est beaucoup plus forte après 72h de traitement (résultats non présentés).

L'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] a aussi été testée suite à l'addition de différentes concentrations de ligands. Aucune activité recombinase n'a pu être observée dans les cellules  $\text{RXR}\alpha^{+/-}(\text{LNL})$ :Cre-GR(I747/T) traitées à l'aldostérone, au cortisol ou à la corticostérone (concentration des ligands allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  M), alors qu'en présence de dex, de triamcinolone acetonide ou de RU486, une activité recombinase est observée dès  $10^{-9}$  M (Figure 11).

On a également montré à l'aide de cette lignée cellulaire que l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] peut être induite par des ligands synthétiques, même lorsque les cellules sont cultivées en présence de ligands naturels (aldostérone, cortisol et corticostérone) à  $10^{-9}$  ou  $10^{-8}$  M.

5 L'excision de séquences localisées entre les sites loxP est obtenue suite à un traitement de 72h à la dexaméthasone à  $10^{-7}$  M ou  $10^{-6}$  M (Figure 12).

L'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] a enfin été testée dans des cellules humaines : des cellules HeLa ont été cotransférées transitoirement avec les vecteurs pCre-LBD[GR(I747/T)] et pRXR $\alpha$ (LNL), puis cultivées soit sans ajout de ligand, soit en présence des ligands indiqués sur la Figure 13. Comme dans les cellules F9, une bande de 191 pb, correspondant au fragment recombiné, est amplifiée à partir d'ADN isolé des cellules traitées avec des ligands synthétiques (Dexamethasone, Triamcinolone acetonide ou RU486 à  $10^{-7}$  M), alors que sans ajout de ligand, 10 ou en présence de ligands naturels tels que l'aldostérone, la corticostérone ou le cortisol aux mêmes concentrations, seul le fragment correspondant à l'allèle sauvage peut être détecté.

15

Ces résultats montrent donc que l'activité recombinase de la protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)] est induite par des ligands synthétiques du récepteur des glucocorticoïdes, alors qu'elle est insensible aux ligands naturels tels que le cortisol, la corticostérone ou l'aldostérone, même à des concentrations aussi élevées que  $10^{-6}$  M. De plus, la présence de ligands naturels n'empêche pas l'induction de l'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] par les ligands synthétiques.

20

25

**EXAMPLE 3** : Induction de l'activité d'une recombinase Cre chimérique chez la souris

1. Matériel et Méthodes  
1.1. Construction de plasmides et établissement de souris transgéniques

30

Le vecteur pCMVCre-LBD[GR(I747/T)] a été construit en clonant le fragment EcoRI de 2 kb isolé de pCre-LBD[GR(I747/T)] dans le site EcoRI de pMGSV1 (60). Le fragment Pvull de 4,64 kb isolé de pCMVCre-LBD[GR(I747/T)] a été injecté dans des zygotes F1 (C57BL/6 X SJL)

à une concentration de 4 ng/ $\mu$ l afin de produire des souris transgéniques selon la procédure classique (61).

### 1.2. Conditions de PCR

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans une solution tampon contenant 10 mM Tris-HCl (pH = 8.8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,25  $\mu$ M de chaque amorce, 2 unités de Taq polymérase et 1  $\mu$ g d'ADN génomique comme matrice. Après 30 cycles (30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 1 min à 72°C) puis 1 cycle (30 sec à 90°C, 30 sec à 55°C, 5 min à 72°C), les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose à 2.2 % coloré au bromure d'ethidium.

### 1.3. Analyse du génotype des souris.

Le transgène Cre-LBD[GR(I747/T)] et les allèles de type sauvage et excisé RXR $\alpha$ <sup>ΔAF2(LNL)</sup> ont été détectés par PCR. La détection du transgène Cre-LBD[GR(I747/T)] a été effectuée à l'aide des amorces nucléotidiques 5'-ATCCGAAAAGAAAACGTTGA-3' et 5'-ATCCAGGTACCGATATAGT-3', celle des allèles du gène RXR $\alpha$  grâce aux amorces 5'-GGTTCTCCGGCCGCTTGGGT-3' et 5'-GAAGGCGATCCGCTGCGAAT-3'. De la même façon, l'excision du marqueur tk-neo encadré de sites loxP a été suivie par PCR à l'aide des amorces A (5'-CAAGGAGCCTCCTTCTCTA-3') et B (5'-CCTGCTCTACCTGGTGACTT-3'). Ces amorces amplifient un fragment d'ADN de 156 paires de bases à partir de l'allèle de type sauvage et un fragment de 190 paires de bases à partir de l'allèle excisé RXR $\alpha$ <sup>ΔAF2(L)</sup>.

## 2. Résultats

L'activité recombinase de Cre-LBD[GR(I747/T)] a également été testée chez la souris. Ainsi, des souris transgéniques exprimant la protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)] sous le contrôle du promoteur du gène "major IE" du cytomegalovirus human ont été établies. La structure du transgène est représentée à la figure 14a. Il contient les séquences activatrices/promotrices du gène "major IE" du cytomegalovirus humain, un intron du gène de la  $\beta$ -globine de lapin, les séquences codantes de Cre-LBD[GR(I747/T)] et le signal de polyadénylation du virus simien SV40. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris 'reporter', afin d'y démontrer l'existence d'une activité recombinase induite. Cette lignée

'reporter' contient une insertion du marqueur de sélection tk-neo, encadré de sites loxP, dans l'intron situé entre les exons 8 et 9 du gène RXR $\alpha$ , sur l'un de ses deux allèles [RXR $\alpha$  $^{\Delta AF2(LNL)}$ ]. Après recombinaison du marqueur tkneo, un site loxP reste en place et constitue l'allèle excisé 5 RXR $\alpha$  $^{\Delta AF2(L)}$ . L'allèle RXR $\alpha$  de type sauvage et l'allèle excisé peuvent être détectés simultanément par amplification PCR en utilisant une paire d'amorce appropriée A et B. La figure 14b représente schématiquement cette stratégie PCR par indication des amorces A et B ainsi que de certains sites de restriction.

10 Les descendants issus du croisement de souris Cre-LBD[GR(1747/T)] et de souris 'reporter', décrites ci-dessus, contenant à la fois le transgène Cre-LBD[GR(1747/T)] et l'allèle RXR $\alpha$  $^{\Delta AF2(LNL)}$ , ont été identifiés en établissant leur génotype à partir d'une biopsie de queue. Une de ces souris a subi à l'âge de quatre semaines une injection intrapéritonéale 15 quotidienne de 0.3 mg de dexaméthasone diluée dans 100  $\mu$ l d'huile végétale, pendant cinq jours. Une biopsie de queue a été prélevée le jour avant la première injection, ainsi que le lendemain de la cinquième injection. L'ADN isolé à partir de ces prélèvements a été analysé par PCR à l'aide des oligonucléotides A et B (figure 15, pistes 2 et 3) pour déterminer 20 si le traitement induit la délétion du marqueur tk-neo. La piste 1 correspond à une réaction contrôle, réalisée sans ADN. La position des produits de PCR amplifiés à partir de l'allèle RXR $\alpha$  de type sauvage et de l'allèle excisé RXR $\alpha$  $^{\Delta AF2(L)}$  sont indiqués. Le marqueur de taille (piste 4) correspond à l'échelle de 1 kb (GibcoBRL). La taille des fragments est 25 donnée en paires de bases. D'après la figure 15, l'excision induite a bien eu lieu après traitement de la souris testée à la dexamethasone. En effet, l'analyse des fragments d'ADN amplifiés à partir de la queue avant traitement ne révèle que la présence de l'allèle RXR $\alpha$  de type sauvage, alors que l'analyse de la queue de la même souris, après traitement, 30 indique la présence de l'allèle excisé RXR $\alpha$  $^{\Delta AF2(LNL)}$  (figure 15). Ainsi, il apparaît que la recombinase chimérique Cre-LBD[GR(1747/T)] ne présente aucune activité constitutive de base en présence des ligands endogènes. Elle est cependant induite et active chez la souris par un traitement à la dexamethasone.

## REFERENCES

1. Evans RM, 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240:889-895.

5

2. Beato M., 1989, Gene regulation by steroid hormones. Cell 56:335-344.

3. Green S, Chambon P., 1988, Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. Trends Genetique 4:309-314.

10

4. Parker MG, 1993, Steroid and related receptors. Curr. Opin. Cell. Biol. 5:499-504.

15

5. Simons SSJr, 1994, Function/activity of specific amino acids in glucocorticoid receptors, New York. Vitam. Horm. 49:49-130.

6. Danielian PS, WHite R, Lees JA, Parker MG, 1992, Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. EMBO J. 11:1025-1033.

20

7. Saatcioglu F., Bartunek P., Deng T., Zenke M., Karin M., 1993, A conserved C-terminal sequence that is deleted in v-ErbA is essential for the biological activities of c-ErbA (the thyroid hormone receptor). Mol. Cell. Biol. 13:3675-3685.

25

8. Barettino D., Vivanco Ruiz MdM., Stunnenberg HG., 1994, Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. EMBO J. 13:3039-3049.

30

9. Durand B., Saunders M., Gaudon C., Roy B., Losson R., Chambon P., 1995, Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. EMBO J. 13:5370-5382.

35

10. Leng XH., Blanco J., Tsai SY., Ozato K., O'Malley BW., 1995, Mouse retinoid X receptor contains a separable ligand-binding and transactivation domain in its E region. Mol. Cell. Biol. 15:255-263.

5 11. Cavaillès V., Dauvois S., Danielian PS., Parker MG., 1994, Interaction of protein with transcriptionally active estrogen receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10009-10013.

10 12. Halachmi S., Marden E., Martin G., MacKay H., Abbondanza C., Brown M., 1994, Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. Science 264:1455-1458.

15 13. Le Douarin B., Zechel C., Garnier JM., Lutz Y., Tora L., Pierrat B., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R. 1995, The N-terminal part of TIF1, a purative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. EMBO J. 14:2020-2033.

20 14. Cavaillès V., Dauvois S., L'Horset F., Lopez G., Hoare S., Kushner PJ., Parker MG., 1995, Nuclear factor RIP 140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. EMBO J. 14:3741-3751.

25 15. Lee JW., Ryan E., Swaffield J., Johnston SA., Moore DD., 1995, Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. Nature 374:91-94.

16. Baur et al., EMBO J., Vol. 15 n° 1, 110-124, 1996.

30 17. Bourguet W., Ruff P., Chambon P., Gronemeyer H., Moras D., 1995, Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . Nature 375:377-382.

18. Renaud et al., Nature, Vol. n° 378 681-689, 1995.

19. Wurtz et al., *Natural Structural Biology*, Vol. 3, 87-93, 1996.

20. Chakraborti PK., Garebedian MJ., Yamamoto KR., Simons SSJ., 1991, Creation of "super" glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain. *J. Biol. Chem.* 266:22075-22078.

5

21. Warriar N., Yu C., Govindan MV., 1994, Hormone binding domain of human glucocorticoid receptor enhancement of transactivation function by substitution mutants M565R and A573Q. *J. Biol. Chem.* 269:29010-29015.

10

22. Chen D., Kohli K., Zhank S., Danielsen M., Stallcup MR., 1994 Phenylalanine-780 near the C-terminus of the mouse glucocorticoid receptor is important for ligand binding affinity and specificity. *Mol. Endocrinol.* 8:422-430.

15

23. Hurley DM., Accili D., Stratakis CA., Karl M., Vamvakopoulos N., Rorer E., Constantine K., Taylor SI., Chrousos GP., 1991, Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest.* 87:680-686.

20

24. Keightley MC., Fuller PJ., 1994, Unique sequences in the Guinea Pig glucocorticoid receptor induce constitutive transactivation and decrease steroid sensitivity. *Mol. Endocrinol.* 8:431-439.

25

25. Chen D., Stallcup MR., 1994, The hormone-binding role of 2 cysteines near the C terminus of the mouse glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 269:7914-1978.

30

26. Byravan S., Milhon J., Rabindran SK., Olinger B., Garabedian MJ., Danielsen M., Stallcup MR., 1991, Two point mutations in the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor that dramatically reduce its function. *Mol. Endocrinol.* 5:752-758.

27. Picard, *Current opinion in biotechnology*, 1994, 5:511515.

28. Metzger et al., PNAS USA Vol 92, July 1995, Genetics, 6991-6995.

29. Logie et al., PNAS USA Vol 92, June 1995, Genetics, 5940-5944.

5 30. Littlewood et al., Nucleic Acids Research 1995, Vol. 23, N° 10, 1686-1690.

31. Sternberg et al., J. Mol. Biol. (1986), 187:197-212.

32. Sauer et Henderson, The New Biologist, Vol. 2, N° 5, (May 1990), 441-  
10 449.

33. Barbonis et al. , Nucleic Acids Research, 1993, Vol. 21, N°9, 2025-2029.

34. Kilby et al., TIG, December 1993, Vol. 9, 413-421.  
15

35. Sauer, Current opinion in Biotechnology, 1994, 5:521-527.

36. Denisen et al., PNAS USA Vol 92, (August 1995), Genetics, 7376-7380,

20 37. C. Babinet, Médecine/Sciences, 1995, n° 8 Vol. 11, 1154-1157.

38. Malchoff DM., Brufsky A., Reardon G., McDermott P., Javier EC., Bergh CH., Rowe D., Malchoff CD., 1993, A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. J. Clin. Invest. 91:1918-1925.  
25

39. J.C. Kaplan et M. Delpech, Biologie Moléculaire et Médecine, 2ème Edition, Edition Flammarion.

40. Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin JR., Chambon P., 1987,  
30 Functional domains of the human estrogen receptor. Cell. 51:941-951.

41. Green S., Issemann I., Sheer E., 1988, A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. Nucl. Acids. Res. 16:369.

42. Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T., 1989, Molecular cloning. A laboratory manual. In: eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

5 43. Webster NJG., Green S., Jin JR., Chambon P., 1988, The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell.* 54:199-207.

10 44. Lanz RB., Rusconi S., 1994, A conserved carboxy-terminal subdomain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology* 135:2183-2195.

15 45. Mahfoudi A., Roulet E., Dauvois S., Parker MG., Wahli W., 1995, Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4206-4210.

20 46. Vegeto E., Allan GF., Schrader WT., Tsai MJ., McDonnel DP., O'Malley BW., 1992, The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell.* 69:703-713.

47. McKnight S., Tjian R. 1986, Transcriptional selectivity of viral genes in Mammalian cells. *Cell.* 46:795-805.

25 48. Schwartz O., Virelizier JL., Montagnier L., Hazan U., 1990, A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene* 88:197-205.

30 49. Bocquel MT., Kumar V., Stricker C., Chambon P., Gronemeyer H., 1989, The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucl. Acids. Res.* 17:2581-2595.

50. Grange T., Roux J., Rigaud G., Pictet R., 1989, Two remote glucocorticoid responsive units interact cooperatively to promote glucocorticoid induction of rat tyrosine aminotransferase gene expression. *Nucl. Acids. Res.* 17:8695-8709.

5 51. Pons M., Gagne D., Nicolas JC., Mehtali M., 1990, A new cellular model of response to estrogens : a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. *Bio Techniques* 9:450-459.

10 52. Green S., Kumar V., Theulaz I., Wahli W., Chambon P., 1988, The N-terminal 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* 7:3037-3044.

15 53. De Wet JR., Wood KV., De Luca M., Helinski DR., Subramani S., 1987, Firefly luciferase gene : structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:725-737.

20 54. Jausons-Loffreda N., Balaguer P., Roux S., Fuentes M., Pons M., Nicolas JC., Gelmini S., Pazzagli M., 1994, Chimeric receptors as a tool for luminiscent measurement of biological activities of steroid hormones. *Jour. Bioluminescence and Chemiluminescence* 9:217-221.

25 55. Kakidanj H., Ptashne M., 1988, Gal4 activated gene expression in mammalian cells. *Cell.* 52:161-167.

56. Hollenberg SM., Weinberger C., Ong ES., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson EB., Rosenfeld MG., Evans RM. 1985, Primary structure and expression of a human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635-641.

30 57. Green et al., 1986, *Nature* 320, 134-139.

58. Mangelsdorf D.J., Borgmeyer V., Heyman R.A., Zhou JY., Ony E.S., Oro A.E., Kakizuka A and Evans R.M. , 1992, *Genes and Development* 6, 329-344.

59. Riele et al., 1990, Nature 348, 649-651.60. Chen and Evans (1993) (Methods in molecular biology, Vol 15 : PCR protocols current methods and applications chap. 7, Edited by : BA White Copyright, 1993, Humana Press Inc. Totowa, NJ).
60. R. Feil, J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, P. Chambon. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 10887-10890.
61. Hogan, B., Costantini, F., & Lacy, E. (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE GENETIQUE MOLECULAIRE (ADEREGEM)
- (B) RUE: 26 RUE MONTPENSIER
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75001

(ii) TITRE DE L' INVENTION: RECEPTEUR NUCLEAIRE DE GLUCOCORTICOIDES MODIFIE, PROTEINE DE FUSION, FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR LEDIT RECEPTEUR ET LADITE PROTEINE DE FUSION, VECTEURS, CELLULES ET ANIMAUX EN COMPRENANT ET PROCEDES DANS LESQUELS ILS SONT MIS EN OEUVRE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 17

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2334 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: GR(I747/T) (Récepteur humain des glucocorticoïdes muté en position 747)
- (B) EMPLACEMENT: 1..2331

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 777 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GAC TCC AAA GAA TCA TTA ACT CCT GGT AGA GAA GAA AAC CCC AGC Met Asp Ser Lys Glu Ser Leu Thr Pro Gly Arg Glu Glu Asn Pro Ser	43
1                   5                   10                   15	

AGT GTG CTT GCT CAG GAG AGG GGA GAT GTG ATG GAC TTC TAT AAA ACC Ser Val Leu Ala Gln Glu Arg Gly Asp Val Met Asp Phe Tyr Lys Thr	96
20                   25                   30	

CTA AGA GGA GGA GCT ACT GTG AAG GTT TCT GCG TCT TCA CCC TCA CTG Leu Arg Gly Gly Ala Thr Val Lys Val Ser Ala Ser Ser Pro Ser Leu	144
35                   40                   45	

GCT GTC GCT TCT CAA TCA GAC TCC AAG CAG CGA AGA CTT TTG GTT GAT Ala Val Ala Ser Gln Ser Asp Ser Lys Gln Arg Arg Leu Leu Val Asp	192
50 55 60	
TTT CCA AAA GGC TCA GTA AGC AAT GCG CAG CAG CCA GAT CTG TCC AAA Phe Pro Lys Gly Ser Val Ser Asn Ala Gln Gln Pro Asp Leu Ser Lys	240
65 70 75 80	
GCA GTT TCA CTC TCA ATG GGA CTG TAT ATG GGA GAG ACA GAA ACA AAA Ala Val Ser Leu Ser Met Gly Leu Tyr Met Gly Glu Thr Glu Thr Lys	268
85 90 95	
GTG ATG GGA AAT GAC CTG GGA TTC CCA CAG CAG GGC CAA ATC AGC CTT Val Met Gly Asn Asp Leu Gly Phe Pro Gln Gln Gly Gln Ile Ser Leu	336
100 105 110	
TCC TCG GGG GAA ACA GAC TTA AAG CTT TTG GAA GAA AGC ATT GCA AAC Ser Ser Gly Glu Thr Asp Leu Lys Leu Leu Glu Glu Ser Ile Ala Asn	384
115 120 125	
CTC AAT AGG TCG ACC AGT GTT CCA GAG AAC CCC AAG AGT TCA GCA TCC Leu Asn Arg Ser Thr Ser Val Pro Glu Asn Pro Lys Ser Ser Ala Ser	432
130 135 140	
ACT GCT GTG TCT GCT GCC CCC ACA GAG AAG GAG TTT CCA AAA ACT CAC Thr Ala Val Ser Ala Ala Pro Thr Glu Lys Glu Phe Pro Lys Thr His	480
145 150 155 160	
TCT GAT GTA TCT TCA GAA CAG CAA CAT TTG AAG GGC CAG ACT GGC ACC Ser Asp Val Ser Ser Glu Gln Gln His Leu Lys Gly Gln Thr Gly Thr	528
165 170 175	
AAC GGT GGC AAT GTG AAA TTG TAT ACC ACA GAC CAA AGC ACC TTT GAC Asn Gly Asn Val Lys Leu Tyr Thr Thr Asp Gln Ser Thr Phe Asp	576
180 185 190	
ATT TTG CAG GAT TTG GAG TTT TCT TCT GGG TCC CCA GGT AAA GAG ACG Ile Leu Gln Asp Leu Glu Phe Ser Ser Gly Ser Pro Gly Lys Glu Thr	624
195 200 205	
AAT GAG AGT CCT TGG AGA TCA GAC CTG TTG ATA GAT GAA AAC TGT TTG Asn Glu Ser Pro Trp Arg Ser Asp Leu Leu Ile Asp Glu Asn Cys Leu	672
210 215 220	
CTT TCT CCT CTG GCG GGA GAA GAC GAT TCA TTC CTT TTG GAA GGA AAC Leu Ser Pro Leu Ala Gly Glu Asp Asp Ser Phe Leu Leu Glu Gly Asn	720
225 230 235 240	
TCG AAT GAG GAC TGC AAG CCT CTC ATT TTA CCG GAC ACT AAA CCC AAA Ser Asn Glu Asp Cys Lys Pro Leu Ile Leu Pro Asp Thr Lys Pro Lys	768
245 250 255	
ATT AAG GAT AAT GGA GAT CTG GTT TTG TCA AGC CCC AGT AAT GTA ACA Ile Lys Asp Asn Gly Asp Leu Val Leu Ser Ser Pro Ser Asn Val Thr	816
260 265 270	
CTG CCC CAA GTG AAA ACA GAA AAA GAA GAT TTC ATC GAA CTC TGC ACC Leu Pro Gln Val Lys Thr Glu Lys Glu Asp Phe Ile Glu Leu Cys Thr	864
275 280 285	
CCT GGG GTA ATT AAG CAA GAG AAA CTG GGC ACA GTT TAC TGT CAG GCA Pro Gly Val Ile Lys Gln Glu Lys Leu Gly Thr Val Tyr Cys Gln Ala	912
290 295 300	
AGC TTT CCT GGA GCA AAT ATA ATT GGT AAT AAA ATG TCT GCC ATT TCT Ser Phe Pro Gly Ala Asn Ile Ile Gly Asn Lys Met Ser Ala Ile Ser	960
305 310 315 320	

GTT CAT GGT GTG AGT ACC TCT GGA GGA CAG ATG TAC CAC TAT GAC ATG Val His Gly Val Ser Thr Ser Gly Gly Gln Met Tyr His Tyr Asp Met 325 330 335	1008
AAT ACA GCA TCC CTT TCT CAA CAG CAG GAT CAG AAG CCT ATT TTT AAT Asn Thr Ala Ser Leu Ser Gln Gln Asp Gln Lys Pro Ile Phe Asn 340 345 350	1056
GTC ATT CCA CCA ATT CCC GTT GGT TCC GAA AAT TGG AAT AGG TGC CAA Val Ile Pro Pro Ile Pro Val Gly Ser Glu Asn Trp Asn Arg Cys Gln 355 360 365	1104
GGA TCT GGA GAT GAC AAC TTG ACT TCT CTG GGG ACT CTG AAC TTC CCT Gly Ser Gly Asp Asp Asn Leu Thr Ser Leu Gly Thr Leu Asn Phe Pro 370 375 380	1152
GGT CGA ACA GTT TTT TCT AAT GGC TAT TCA AGC CCC AGC ATG AGA CCA Gly Arg Thr Val Phe Ser Asn Gly Tyr Ser Ser Pro Ser Met Arg Pro 385 390 395 400	1200
GAT GTA AGC TCT CCT CCA TCC AGC TCC TCA ACA GCA ACA ACA GGA CCA Asp Val Ser Ser Pro Pro Ser Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Pro 405 410 415	1248
CCT CCC AAA CTC TGC CTG GTG TGC TCT GAT GAA GCT TCA GGA TGT CAT Pro Pro Lys Leu Cys Leu Val Cys Ser Asp Glu Ala Ser Gly Cys His 420 425 430	1296
TAT GGA GTC TTA ACT TGT GGA AGC TGT AAA GTT TTC TTC AAA AGA GCA Tyr Gly Val Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala 435 440 445	1344
GTG GAA GGA CAG CAC AAT TAC CTA TGT GCT GGA AGG AAT GAT TGC ATC Val Glu Gly Gln His Asn Tyr Leu Cys Ala Gly Arg Asn Asp Cys Ile 450 455 460	1392
ATC GAT AAA ATT CGA AGA AAA AAC TGC CCA GCA TGC CGC TAT CGA AAA Ile Asp Lys Ile Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ala Cys Arg Tyr Arg Lys 465 470 475 480	1440
TGT CTT CAG GCT GGA ATG AAC CTG GAA GCT CGA AAA ACA AAG AAA AAA Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys Lys Lys 485 490 495	1488
ATA AAA GGA ATT CAG CAG GCC ACT ACA GGA GTC TCA CAA GAA ACC TCT Ile Lys Gly Ile Gln Gln Ala Thr Thr Gly Val Ser Gln Glu Thr Ser 500 505 510	1536
GAA AAT CCT GGT AAC AAA ACA ATA GTT CCT GCA ACG TTA CCA CAA CTC Glu Asn Pro Gly Asn Lys Thr Ile Val Pro Ala Thr Leu Pro Gln Leu 515 520 525	1584
ACC CCT ACC CTG GTG TCA CTG TTG GAG GTT ATT GAA CCT GAA GTG TTA Thr Pro Thr Leu Val Ser Leu Leu Glu Val Ile Glu Pro Glu Val Leu 530 535 540	1632
TAT GCA GGA TAT GAT AGC TCT GTT CCA GAC TCA ACT TGG AGG ATC ATG Tyr Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Val Pro Asp Ser Thr Trp Arg Ile Met 545 550 555 560	1680
ACT ACG CTC AAC ATG TTA GGA GGG CGG CAA GTG ATT GCA GCA GTG AAA Thr Thr Leu Asn Met Leu Gly Gly Arg Gln Val Ile Ala Ala Val Lys 565 570 575	1728
TGG GCA AAG GCA ATA CCA GGT TTC AGG AAC TTA CAC CTG GAT GAC CAA Trp Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Leu Asp Asp Gln 580 585 590	1776

ATG ACC CTA CTG CAG TAC TCC TGG ATG TTT CTT ATG GCA TTT GCT CTG Met Thr Leu Leu Gln Tyr Ser Trp Met Phe Leu Met Ala Phe Ala Leu 595 600 605	1824
GGG TGG AGA TCA TAT AGA CAA TCA AGT GCA AAC CTG CTG TGT TTT GCT Gly Trp Arg Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Ala Asn Leu Leu Cys Phe Ala 610 615 620	1872
CCT GAT CTG ATT ATT AAT GAG CAG AGA ATG ACT CTA CCC TGC ATG TAC Pro Asp Leu Ile Ile Asn Glu Gln Arg Met Thr Leu Pro Cys Met Tyr 625 630 635 640	1920
GAC CAA TGT AAA CAC ATG CTG TAT GTT TCC TCT GAG TTA CAC AGG CTT Asp Gln Cys Lys His Met Leu Tyr Val Ser Ser Glu Leu His Arg Leu 645 650 655	1968
CAG GTA TCT TAT GAA GAG TAT CTC TGT ATG AAA ACC TTA CTG CTT CTC Gln Val Ser Tyr Glu Glu Tyr Leu Cys Met Lys Thr Leu Leu Leu 660 665 670	2016
TCT TCA GTT CCT AAG GAC GGT CTG AAG AGC CAA GAG CTA TTT GAT GAA Ser Ser Val Pro Lys Asp Gly Leu Lys Ser Gln Glu Leu Phe Asp Glu 675 680 685	2064
ATT AGA ATG ACC TAC ATC AAA GAG CTA GGA AAA GCC ATT GTC AAG AGG Ile Arg Met Thr Tyr Ile Lys Glu Leu Gly Lys Ala Ile Val Lys Arg 690 695 700	2112
GAA GGA AAC TCC AGC CAG AAC TGG CAG CGG TTT TAT CAA CTG ACA AAA Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Trp Gln Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys 705 710 715 720	2160
CTC TTG GAT TCT ATG CAT GAA GTG GTT GAA AAT CTC CTT AAC TAT TGC Leu Leu Asp Ser Met His Glu Val Val Glu Asn Leu Leu Asn Tyr Cys 725 730 735	2208
TTC CAA ACA TTT TTG GAT AAG ACC ATG TCC ACC GAG TTC CCC GAG ATG Phe Gln Thr Phe Leu Asp Lys Thr Met Ser Thr Glu Phe Pro Glu Met 740 745 750	2256
TTA GCT GAA ATC ATC ACC AAT CAG ATA CCA AAA TAT TCA AAT GGA AAT Leu Ala Glu Ile Ile Thr Asn Gln Ile Pro Lys Tyr Ser Asn Gly Asn 755 760 765	2304
ATC AAA AAA CTT CTG TTT CAT CAA AAG TGA Ile Lys Lys Leu Leu Phe His Gln Lys 770 775	2334

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 2004 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CRE-LBD(GR(I747/T)) (Protéine de fusion du domaine LBD du récepteur humain des glucocorticoïdes muté en position 747 et de la protéine recombinase Cre)

(B) EMPLACEMENT: 1..2001

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 667 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC CAA AAT TTG CCT GCA TTA CCG GTC	48
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val	
1 5 10 15	
GAT GCA ACG AGT GAT GAG GTT CGC AAG AAC CTG ATG GAC ATG TTC AGG	96
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg	
20 25 30	
GAT CGC CAG GCG TTT TCT GAG CAT ACC TGG AAA ATG CTT CTG TCC GTT	144
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val	
35 40 45	
TGC CGG TCG TGG GCG GCA TGG TGC AAG TTG AAT AAC CGG AAA TGG TTT	192
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe	
50 55 60	
CCC GCA GAA CCT GAA GAT GTT CGC GAT TAT CTT CTA TAT CTT CAG GCG	240
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala	
65 70 75 80	
CGC GGT CTG GCA GTA AAA ACT ATC CAG CAA CAT TTG GGC CAG CTA AAC	288
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn	
85 90 95	
ATG CTT CAT CGT CGG TCC GGG CTG CCA CGA CCA AGT GAC AGC AAT GCT	336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	
100 105 110	
GTT TCA CTG GTT ATG CGG CGG ATC CGA AAA GAA AAC GTT GAT GCC GGT	384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	
115 120 125	
GAA CGT GCA AAA CAG GCT CTA GCG TTC GAA CGC ACT GAT TTC GAC CAG	432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
130 135 140	
GTT CGT TCA CTC ATG GAA AAT AGC GAT CGC TGC CAG GAT ATA CGT AAT	480
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
145 150 155 160	
CTG GCA TTT CTG GGG ATT GCT TAT AAC ACC CTG TTA CGT ATA GCC GAA	528
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
165 170 175	
ATT GCC AGG ATC AGG GTT AAA GAT ATC TCA CGT ACT GAC GGT GGG AGA	576
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
180 185 190	
ATG TTA ATC CAT ATT GGC AGA ACG AAA ACG CTG GTT AGC ACC GCA GGT	624
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
195 200 205	
GTA GAG AAG GCA CTT AGC CTG GGG GTA ACT AAA CTG GTC GAG CGA TGG	672
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
210 215 220	

ATT TCC GTC TCT GGT GTA GCT GAT GAT CCG AAT AAC TAC CTG TTT TGC Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys 225 230 235 240	720
CGG GTC AGA AAA AAT GGT GTT GCC GCG CCA TCT GCC ACC AGC CAG CTA Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu 245 250 255	768
TCA ACT CGC GCC CTG GAA GGG ATT TTT GAA GCA ACT CAT CGA TTG ATT Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile 260 265 270	816
TAC GGC GCT AAG GAT GAC TCT GGT CAG AGA TAC CTG GCC TGG TCT GGA Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly 275 280 285	864
CAC AGT GCC CGT GTC GGA GCC GCG CGA GAT ATG GCC CGC GCT GGA GTT His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val 290 295 300	912
TCA ATA CCG GAG ATC ATG CAA GCT GGT GGC TGG ACC AAT GTA AAT ATT Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile 305 310 315 320	960
GTC ATG AAC TAT ATC CGT AAC CTG GAT AGT GAA ACA GGG GCA ATG GTG Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val 325 330 335	1003
CGC CTG CTG GAA GAT GGC GAT CTC GAG ATT CAG CAG GCC ACT ACA GGA Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Ile Gln Gln Ala Thr Thr Gly 340 345 350	1056
GTC TCA CAA GAA ACC TCT GAA AAT CCT GGT AAC AAA ACA ATA GTT CCT Val Ser Gln Glu Thr Ser Glu Asn Pro Gly Asn Lys Thr Ile Val Pro 355 360 365	1104
GCA ACG TTA CCA CAA CTC ACC CCT ACC CTG GTG TCA CTG TTG GAG GTT Ala Thr Leu Pro Gln Leu Thr Pro Thr Leu Val Ser Leu Leu Glu Val 370 375 380	1152
ATT GAA CCT GAA GTG TTA TAT GCA GGA TAT GAT AGC TCT GTT CCA GAC Ile Glu Pro Glu Val Leu Tyr Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Val Pro Asp 385 390 395 400	1200
TCA ACT TGG AGG ATC ATG ACT ACG CTC AAC ATG TTA GGA GGG CGG CAA Ser Thr Trp Arg Ile Met Thr Thr Leu Asn Met Leu Gly Gly Arg Gln 405 410 415	1248
GTG ATT GCA GCA GTG AAA TGG GCA AAG GCA ATA CCA GGT TTC AGG AAC Val Ile Ala Ala Val Lys Trp Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Arg Asn 420 425 430	1296
TTA CAC CTG GAT GAC CAA ATG ACC CTA CTG CAG TAC TCC TGG ATG TTT Leu His Leu Asp Asp Gln Met Thr Leu Leu Gln Tyr Ser Trp Met Phe 435 440 445	1344
CTT ATG GCA TTT GCT CTG GGG TGG AGA TCA TAT AGA CAA TCA AGT GCA Leu Met Ala Phe Ala Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Ala 450 455 460	1392
AAC CTG CTG TGT TTT GCT CCT GAT CTG ATT ATT AAT GAG CAG AGA ATG Asn Leu Leu Cys Phe Ala Pro Asp Leu Ile Ile Asn Glu Gln Arg Met 465 470 475 480	1440
ACT CTA CCC TGC ATG TAC GAC CAA TGT AAA CAC ATG CTG TAT GTT TCC Thr Leu Pro Cys Met Tyr Asp Gln Cys Lys His Met Leu Tyr Val Ser 485 490 495	1488

TCT GAG TTA CAC AGG CTT CAG GTA TCT TAT GAA GAG TAT CTC TGT ATG Ser Glu Leu His Arg Leu Gln Val Ser Tyr Glu Glu Tyr Leu Cys Met 500 505 510	1536
AAA ACC TTA CTG CTT CTC TCT TCA GTT CCT AAG GAC GGT CTG AAG AGC Lys Thr Leu Leu Leu Ser Ser Val Pro Lys Asp Gly Leu Lys Ser 515 520 525	1584
CAA GAG CTA TTT GAT GAA ATT AGA ATG ACC TAC ATC AAA GAG CTA GGA Gln Glu Leu Phe Asp Glu Ile Arg Met Thr Tyr Ile Lys Glu Leu Gly 530 535 540	1632
AAA GCC ATT GTC AAG AGG GAA GGA AAC TCC AGC CAG AAC TGG CAG CGG Lys Ala Ile Val Lys Arg Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Trp Gln Arg 545 550 555 560	1680
TTT TAT CAA CTG ACA AAA CTC TTG GAT TCT ATG CAT GAA GTG GTT GAA Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Met His Glu Val Val Glu 565 570 575	1728
AAT CTC CTT AAC TAT TGC TTC CAA ACA TTT TTG GAT AAG ACC ATG TCC Asn Leu Leu Asn Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Leu Asp Lys Thr Met Ser 580 585 590	1776
ACC GAG TTC CCC GAG ATG TTA GCT GAA ATC ATC ACC AAT CAG ATA CCA Thr Glu Phe Pro Glu Met Leu Ala Glu Ile Ile Thr Asn Gln Ile Pro 595 600 605	1824
AAA TAT TCA AAT GGA AAT ATC AAA AAA CTT CTG TTT CAT CAA AAG GGT Lys Tyr Ser Asn Gly Asn Ile Lys Lys Leu Leu Phe His Gln Lys Gly 610 615 620	1872
ACC AGC CGT GGA GGG GCA TCC GTG GAG GAG ACG GAC CAA AGC CAC TTG Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu 625 630 635 640	1920
GCC ACT GCG GGC TCT ACT TCA TCG CAT TCC TTG CAA AAG TAT TAC ATC Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile 645 650 655	1968
ACG GGG GAG GCA GAG GGT TTC CCT GCC ACA GTC TGA Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro Ala Thr Val 660 665	2004

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 6094 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: circulaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE:pCRE-LBD[GR(I747/T)] (Plasmide d'expression de la protéine de fusion Cre-LBD[GR(I747/T)])

- (B) EMPLACEMENT:1..6091

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GTCGACTTCT GAGGC GGAAA GAACC AGCTG TGGAAT GTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG	60
TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC	120
AGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT	180
TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCCATCC CGCCCTAAC TCCGCCAGT	240
TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTA TTTATGCAGA GGCGAGGCC	300
GCCTCGGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTGAGG CCTAGGCTTT	360
TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTT	420
TTTCTTTTC GCTATTGTA AATTCA TGTGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTT TCAGGGTGT	480
GTTTAGAATG GGAAGATGTC CCTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTCTT	540
TCACCTTCTA CTCTGTTGAC AACCA TTGTC TCCTCTTATT TTCTTTCAT TTTCTGTAAC	600
TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTGTA ACGAATTTT AAATTCACCT TTGTTTATT	660
GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAAC TCACT TTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA	720
TTGTACTTCA GCACAGTTT AGAGAACAA TGT TATAATT AAATGATAAG GTAGAATATT	780
TCTGCATATA AATTCTGGCT GGCGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT	840
GGTCATCATC CTGCCTTCT CTTATGGTT ACAATGATAT ACAC TGTGTTG AGATGAGGAT	900
AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT TCTTCTTTT	960
CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTGCTGTCT CATCATTG GCAAAGAATT	1020
GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTCCA CCATGTCCAA TTTACTGACC GTACACCAAA	1080

ATTTGCCTGC ATTACCGGTC GATGCAACGA GTGATGAGGT TCGCAAGAAC CTGATGGACA 1140  
TGTCAGGGA TCGCCAGGCG TTTCTGAGC ATACCTGGAA AATGCTTCTG TCCGTTGCC 1200  
GGTCGTGGGC GGCATGGTGC AAGTTGAATA ACCGGAAATG GTTTCCCGCA GAACCTGAAG 1260  
ATGTTCGCGA TTATCTTCTA TATCTTCAGG CGCGCGGTCT GGCAGTAAAA ACTATCCAGC 1320  
AACATTGGG CCAGCTAAC ATGCTTCATC GTCGGTCCGG GCTGCCACGA CCAAGTGACA 1380  
GCAATGCTGT TTCACTGGTT ATGCGGCAGA TCCGAAAAGA AAACGTTGAT GCCGGTGAAC 1440  
GTGCAAAACA GGCTCTAGCG TTCGAACGCA CTGATTCGA CCAGGTTCGT TCACTCATGG 1500  
AAAATAGCGA TCGCTGCCAG GATATACGTA ATCTGGCATT TCTGGGGATT GCTTATAACA 1560  
CCCTGTTACG TATAGCCGAA ATTGCCAGGA TCAGGGTTAA AGATATCTCA CGTACTGACG 1620  
GTGGGAGAAT GTTAATCCAT ATTGGCAGAA CGAAAACGCT GGTTAGCACC GCAGGTGTAG 1680  
AGAAGGCACT TAGCCTGGGG GTAACCTAAC TGTCGAGCG ATGGATTCC GTCTCTGGTG 1740  
TAGCTGATGA TCCGAATAAC TACCTGTTT GCCGGGTCAG AAAAATGGT GTTGCCGCGC 1800  
CATCTGCCAC CAGCCAGCTA TCAACTCGCG CCCTGGAAGG GATTTTGAA GCAACTCATC 1860  
GATTGATTA CGCGCTAAG GATGACTCTG GTCAGAGATA CCTGGCCTGG TCTGGACACA 1920  
GTGCCCGTGT CGGAGCCGCG CGAGATATGG CCCGCGCTGG AGTTCAATA CGGGAGATCA 1980  
TGCAAGCTGG TGGCTGGACC AATGTAAATA TTGTCATGAA CTATATCCGT AACCTGGATA 2040  
GTGAAACAGG GGCAATGGTG CGCCTGCTGG AAGATGGCGA TCTCGAGATT CAGCAGGCCA 2100  
CTACAGGAGT CTCACAAGAA ACCTCTGAAA ATCCTGGTAA CAAAACAATA GTTCCTGCAA 2160  
CGTTACCACA ACTCACCCCT ACCCTGGTGT CACTGTTGGA GGTTATTGAA CCTGAAGTGT 2220  
TATATGCAGG ATATGATAGC TCTGTTCCAG ACTCAACTTG GAGGATCATG ACTACGCTCA 2280

ACATGTTAGG AGGGCGGCAA GTGATTGCAG CAGTGAAATG GGCAAAGGCA ATACCAGGTT 2340  
TCAGGAACTT ACACCTGGAT GACCAAATGA CCCTACTGCA GTACTCCTGG ATGTTCTTA 2400  
TGGCATTGTC TCTGGGTGG AGATCATATA GACAATCAAG TGCAAACCTG CTGTGTTTG 2460  
CTCCTGATCT GATTATTAAT GAGCAGAGAA TGACTCTACC CTGCATGTAC GACCAATGTA 2520  
AACACATGCT GTATGTTCC TCTGAGTTAC ACAGGCTTCA GGTATCTTAT GAAGAGTATC 2580  
TCTGTATGAA AACCTTACTG CTTCTCTCTT CAGTTCTAA GGACGGTCTG AAGAGCCAAG 2640  
AGCTATTTGA TGAAATTAGA ATGACCTACA TCAAAGAGCT AGGAAAAGCC ATTGTCAAGA 2700  
GGGAAGGAAA CTCCAGCCAG AACTGGCAGC GGTTTATCA ACTGACAAAA CTCTGGATT 2760  
CTATGCATGA AGTGGTTGAA AATCTCTTA ACTATTGCTT CCAAACATTT TTGGATAAGA 2820  
CCATGTCCAC CGAGTTCCCC GAGATGTTAG CTGAAATCAT CACCAATCAG ATACCAAAAT 2880  
ATTCAAATGG AAATATCAAA AAACTTCTGT TTCATCAAAA GGGTACCAGC CGTGGAGGGG 2940  
CATCCGTGGA GGAGACGGAC CAAAGCCACT TGGCCACTGC GGGCTCTACT TCATCGCATT 3000  
CCTTGCAAAA GTATTACATC ACGGGGGAGG CAGAGGGTTT CCCTGCCACA GTCTGAGAGC 3060  
TCCCTGGAAT TCGGATCTTA TTAAAGCAGA ACTTGTCTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA 3120  
AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTCACAA ATAAAGCATT TTTTCACTG CATTCTAGTT 3180  
GTGGTTGTC CAAACTCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG GTCGACTCTA GACTCTCCG 3240  
CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC 3300  
ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT 3360  
GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTCC 3420  
ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA 3480

ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGC GT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC	3540
CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG	3600
CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC	3660
TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC	3720
GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA	3780
GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGC GG TG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT	3840
ACGGCTACAC TAGAAGGACA GTATTTGGTA TCTGCCCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG	3900
GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTT	3960
TTGTTTGC AA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTGATCT	4020
TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA	4080
GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA	4140
TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC	4200
CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA	4260
TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC	4320
CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA	4380
GAAGTGGTCC TGCAACTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAAGCTA	4440
GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG	4500
TGGTGTACG CTCGTCGTTT GGTATGGCTT CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC	4560
GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG	4620
TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT	4680

CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAAGT 4740  
CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGCGCACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA 4800  
ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGAAAACGT TCTTCGGGC 4860  
GAAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC 4920  
CCAAC TGATC TTCAGCATCT TTTACTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA 4980  
GGCAAAATGC CGCAAAAAAG GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT 5040  
TCCTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT 5100  
TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTCCCGCG CACATTCCC CGAAAAGTGC 5160  
CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA 5220  
CGAGGCCCTT TCCTCGC GCGTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG 5280  
CTCCCGGAGA CGGTACAGC TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG 5340  
GGCGCGTCAG CGGGTGTGG CGGGTGTGG GGCTGGCTTA ACTATGCCG ATCAGAGCAG 5400  
ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA 5460  
TACCGCATCA GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTGTTAAA ATTGCGCTTA AATTTTGTT 5520  
AAATCAGCTC ATTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG 5580  
AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTTTC CAGTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA 5640  
ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG 5700  
AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC 5760  
CTAAAGGGAG CCCCCGATT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGAACGTG GCGAGAAAGG 5820  
AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC 5880

GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCG CGCCATTGC 5940

CATTCAGGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCTCTTCG CTATTACGCC 6000

AGCTGGCGAA AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTCCC 6060

AGTCACGACG TTGTAAAACG ACGGCCAGTG AATT 6094

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: SG52

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CTGGAAGATG GCGATCTCGA GATTCAAGCAG GCCACT 36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: SG53

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTGTTTCATC AAAAGGGTAC CAGCCGTGGA GGGGCAT 37

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligonucléotide synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ATTATTATTA CTCGAGTGAT GATG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligonucléotide synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATCATCATCA TCCGAGTAAT AATA

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: SB211

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGCAAACACT ATGG

14

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: PZ105

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TTGCGTACTG TCCTCTT

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligonucléotide synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAGAAGCCCT TGCAGCCCTC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: oligonucléotide synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AATTATAACT TCGTATAATG TATGCTATAC GAAGTTATTG

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: amorce

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

ATCCGAAAAG AAAACGTTGA

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: amorce

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

ATCCAGGTTA CGGATATACT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: amorce

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGTTCTCCGG CCGCTTGGGT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: amorce

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GAAGGCGATG CGCTGCGAAT

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: amorce A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CAAGGAGCCT CCTTCTCTA

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: amorce B

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CCTGCTCTAC CTGGTGACTT

20

## REVENDICATIONS

1. Fragment d'ADN codant pour un récepteur nucléaire de glucocorticoïdes modifié, notamment muté dans la région codant pour le domaine de liaison du ligand, de sorte que l'activité dudit récepteur est inductible plus fortement par un ligand glucocorticoïde synthétique que par un ligand glucocorticoïde naturel.  
5
2. Fragment d'ADN codant pour le récepteur nucléaire des glucocorticoïdes sauvage avec une mutation isoleucine --> thréonine située entre les hélices H11 et H12 de la séquence d'acides aminés dudit récepteur.  
10
3. Fragment d'ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, une séquence codant pour le récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes dont la séquence en acides aminés est substantiellement telle que représentée dans l'IDS n°1.  
15
4. Fragment d'ADN selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il a pour séquence la séquence de l'ADNc du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes substantiellement telle que représentée dans l'IDS n° 1  
20
5. Fragment d'ADN codant pour un domaine de liaison du ligand (LBD) d'un récepteur nucléaire des glucocorticoïdes comportant une modification, notamment une mutation de sorte que l'activité dudit domaine de liaison du ligand est inductible plus fortement par liaison à un ligand glucocorticoïde synthétique que par liaison à un glucocorticoïde naturel.  
25
- 30 6. Fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes naturel avec une mutation isoleucine --> thréonine en position correspondant à la position 747 de la séquence en acides aminés dudit récepteur complet.

7. Fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, une séquence codant pour les acides aminés du domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes dont la séquence en acides aminés est substantiallement telle que représentée dans l'IDS n° 1 de l'acide aminé 532 à l'acide aminé 777.

8. Fragment d'ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il a pour séquence la séquence codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes substantiallement telle que représentée dans l'IDS n° 1 du codon 532 au codon 777.

9. Récepteur nucléaire des glucocorticoïdes modifié, notamment muté dans la région du domaine de liaison du ligand, de sorte que l'activité dudit récepteur est inducible plus fortement par un ligand glucocorticoïde synthétique que par un ligand glucocorticoïde naturel.

10. Récepteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il a pour séquence, la séquence en acides aminés du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes sauvage avec une mutation isoleucine --> thréonine située entre les hélices H11 et H12.

11. Récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il a pour séquence en acides aminés, une séquence substantiallement telle que représentée dans l'IDS n°1.

12. Domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes selon l'une des revendications 9 à 11.

13. Domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes LBD [GR(I747/T)], caractérisé en ce qu'il a pour séquence, la séquence en acides aminés du domaine de liaison du ligand du récepteur des glucocorticoïdes humain substantiellement telle que représentée dans l'IDS n° 1 de l'acide aminé 532 à l'acide aminé 777.

14. Système vectoriel d'expression conditionnelle d'une protéine notamment une protéine étrangère dans des cellules hôtes comportant un élément de contrôle de la transcription inductible par un complexe formé par un récepteur nucléaire des glucocorticoïdes et un ligand, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un premier fragment d'ADN consistant en un fragment d'ADN codant pour ladite protéine sous le contrôle d'éléments assurant son expression dans lesdites cellules hôtes, lesdits éléments assurant son expression comprenant une séquence de contrôle de transcription (RE) inductible par le récepteur selon l'une des revendications 9 à 11, complexé à un ligand glucocorticoïde synthétique, et
- un deuxième fragment d'ADN consistant en un fragment d'ADN fonctionnel codant pour ledit récepteur selon l'une des revendications 1 à 4 ou seulement une partie dudit fragment comprenant la région qui reconnaît le ligand (LBD) selon l'une des revendications 5 à 8, et la région de liaison à l'ADN (DBD) qui se fixe sur ladite séquence de contrôle de la transcription (RE),
- lesdits premier et deuxième fragments d'ADN pouvant être portés par un même vecteur ou deux vecteurs séparément.

15. Système vectoriel selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comporte l'ADNc codant pour :

- la région LBD, représentée par des codons codant les acides aminés n° 532 à 777 dans l'IDS n° 1, et
- la région DBD, représentée par des codons codant les acides aminés n° 421 à 487 dans l'IDS n° 1.

16. Système vectoriel selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'on remplace la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur des glucocorticoïdes par celle d'un autre transactivateur, notamment celui de la protéine de levure Gal 4 et on remplace la séquence de contrôle de transcription (RE) du récepteur des glucocorticoïdes par celle reconnue par ledit autre transactivateur, notamment la séquence 17m reconnue par le transactivateur Gal 4.

17. Procédé d'expression d'une protéine étrangère dans des cellules humaines ou animales notamment de mammifères, caractérisé en ce que l'on cultive des cellules qui contiennent un système vectoriel selon l'une des revendications 14 à 16, et en ce qu'on ajoute ledit ligand synthétique, dans le milieu de culture, puis on récupère la protéine synthétisée.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit ligand synthétique est choisi parmi la dexaméthasone, le triamcinolone acétonide, le RU2836, le bimétrazole, le déacylcortivazol et le fluocinolone acetonide.

19. Gène de fusion comprenant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 8 et un fragment d'ADN codant pour une protéine dont on veut réguler l'activité, ladite activité étant inducible plus fortement par liaison dudit récepteur ou dudit domaine de liaison du ligand du récepteur avec undit ligand glucocorticoïde synthétique qu'avec un ligand glucocorticoïde naturel, lorsque ladite protéine se trouve fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand dudit récepteur.

20. Gène de fusion selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite protéine est une protéine recombinase.

21. Gène de fusion selon la revendication 20, caractérisé en ce que ladite protéine est une recombinase de la famille des intégrases  $\lambda$ .

22. Gène de fusion selon la revendication 21, caractérisé en ce que la protéine recombinase est la recombinase Cre du bactériophage P<sub>1</sub>.

23. Gène de fusion selon la revendication 22, comprenant un fragment d'ADN codant pour la protéine recombinase Cre du bactériophage P<sub>1</sub>, et le fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes modifié 5 selon l'une des revendications 5 ou 8.

24. Gène de fusion selon la revendication 23, comprenant dans le sens 5' --> 3' :

- 10 - un fragment d'ADN codant pour la recombinase Cre du bactériophage P<sub>1</sub>;
- un fragment d'ADN codant pour tout ou partie de la région charnière D du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes, région située entre le domaine DBD et le domaine LBD, et
- 15 - le fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) modifié, notamment muté, du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes selon l'une des revendications 5 ou 8.

25. Gène de fusion selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il a pour séquence une séquence codant pour les acides aminés de l'IDS n° 2 20 comprenant :

- les acides aminés 1 à 343 qui correspondent à la recombinase Cre ;
- les acides aminés 346 à 377 qui correspondent à la région C-terminale de la région D du récepteur humain des glucocorticoïdes;
- les acides aminés 378 à 623 qui correspondent au LBD [GR(I747/T)].

25  
26. Gène de fusion selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il a substantiellement la séquence Cre-LBD[GR(I747/T)] telle que représentée dans l'IDS n° 2 dont les acides aminés 626 à 667 correspondent à la région F du récepteur humain des oestrogènes.

30  
35  
27. Vecteur d'expression de la protéine de fusion codée par le gène de fusion selon l'une des revendications 19 à 26 dans des cellules hôtes animales notamment de mammifères, caractérisé en ce qu'il comporte le gène de fusion selon l'une des revendications 19 à 26, placé sous le contrôle d'éléments d'expression assurant son expression dans lesdites cellules hôtes.

28. Protéine de fusion comprenant un récepteur selon l'une des revendications 9 à 11 ou un domaine de liaison du ligand selon l'une des revendications 12 ou 13 et une protéine dont l'activité est inducible plus fortement par liaison dudit récepteur ou dudit domaine de liaison du ligand (LBD) avec undit ligand glucocorticoïde synthétique qu'avec un ligand glucocorticoïde naturel.

29. Protéine de fusion selon la revendication 28, caractérisée en ce que la protéine est une protéine recombinase.

10

30. Protéine de fusion selon la revendication 28, caractérisée en ce que la protéine est une protéine recombinase de la famille des intégrases  $\lambda$ .

15

31. Protéine de fusion selon la revendication 30, caractérisée en ce que la recombinase est la protéine Cre du bactériophage P<sub>1</sub>.

20

32. Protéine de fusion selon la revendication 31, comportant en outre la partie C- terminale de la région charnière D du récepteur nucléaire humain des glucocorticoïdes, intercalée entre la protéine Cre et ledit domaine de liaison du ligand du récepteur modifié selon l'une des revendications 12 ou 13.

25

33. Procédé de recombinaison, notamment, d'excision, insertion, inversion ou translocation conditionnelle au niveau d'un fragment d'ADN contenant un ou deux sites de reconnaissance spécifique d'une protéine recombinase dans des cellules hôtes animales, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes dans lesquelles :

30

1) on introduit une protéine de fusion selon l'une des revendications 29 à 32 ou un vecteur d'expression de ladite protéine de fusion selon la revendication 27 dans lesdites cellules hôtes dans des conditions permettant l'expression d'une protéine de fusion selon l'une des revendications 29 à 32 et,

35

2) on complexe ladite protéine de fusion avec ledit ligand glucocorticoïde synthétique, en mettant ledit ligand en présence desdites cellules hôtes.

34. Procédé de délétion conditionnelle d'un fragment d'ADN dans un gène dans lequel on met en oeuvre un procédé d'excision selon la revendication 33, et dans lequel ledit fragment d'ADN à exciser est intégré entre deux sites de reconnaissance de protéine recombinase orientés en 5 répétition directe.

35. Procédé selon l'une des revendications 33 ou 34, caractérisé en ce que lesdits sites de reconnaissance spécifique de protéine recombinase sont les sites loxP et ladite protéine recombinase est la protéine Cre du 10 bactériophage P<sub>1</sub>.

36. Procédé selon l'une des revendications 33 à 35, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN que l'on veut exciser et lesdits sites de reconnaissance spécifiques d'une protéine recombinase sont portés par 15 un vecteur plasmidique ou viral, ou intégrés dans un chromosome des cellules hôtes.

37. Procédé selon l'une des revendications 33 à 36, caractérisé en ce que l'intégration des sites de reconnaissance spécifique de la protéine recombinase, notamment du ou des sites loxP, se fait par recombinaison homologue du gène comportant ledit fragment d'ADN à insérer ou transloquer ou respectivement à exciser ou inverser avec undit gène modifié comportant ledit fragment d'ADN flanqué en 5' et/ou 3' par le ou 20 lesdit(s) site(s) de reconnaissance de recombinase, notamment site(s) loxP.

25

38. Vecteur de transfert d'un fragment d'ADN dans des cellules hôtes humaines ou animales, notamment mammifères, caractérisé en ce qu'il comporte undit fragment d'ADN à transférer comprenant des sites de reconnaissance spécifiques de la recombinase, notamment deux sites loxP 30 orientés à répétition directe et une cassette d'expression d'un gène de fusion selon l'une des revendications 19 à 26.

39. Vecteur selon la revendication 38, caractérisé en ce que le gène de fusion est placé sous le contrôle d'éléments d'expression spécifiques des cellules hôtes.

5 40. Vecteur selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence du plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)] de l'IDS n° 3.

10 41. Procédé selon l'une des revendications 33 à 37, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN à exciser a été transféré, notamment intégré dans le chromosome desdites cellules, à l'aide d'un vecteur de transfert selon la revendication 38.

15 42. Vecteur selon la revendication 27 ou 38 pour une utilisation comme médicament en thérapie génique en combinaison avec un ligand glucocorticoïde synthétique, notamment la dexaméthasone.

20 43. Cellule humaine ou animale, notamment de mammifères transfectée par un vecteur d'expression d'une protéine de fusion selon la revendication 27.

44. Cellule humaine ou animale, dans laquelle un fragment d'ADN a été transféré à l'aide d'un vecteur, selon l'une des revendications 38 ou 39.

25 45. Cellule animale, notamment de mammifères exprimant de façon constitutive la protéine de fusion selon l'une des revendications 28 à 32.

30 46. Animal transgénique, notamment souris, comportant un gène fonctionnel de la protéine de fusion selon l'une des revendications 28 à 32 notamment intégré dans un de ses chromosomes.

47. Animal transgénique selon la revendication 46 dans lequel un gène d'intérêt est modifié par insertion de un ou plusieurs site(s) loxP, notamment intégré(s) dans un ou plusieurs de ses chromosomes.

5        48. Utilisation d'un vecteur, de cellules ou d'un animal selon l'une des revendications 45 à 47, comme outil d'analyse ou étude de fonctionnement d'un gène donné d'une cellule hôte.

10      49. Méthode de traitement des cellules ex vivo ou in vitro impliquant la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 33 à 37 ou 41 et l'utilisation d'un vecteur selon la revendication 42.

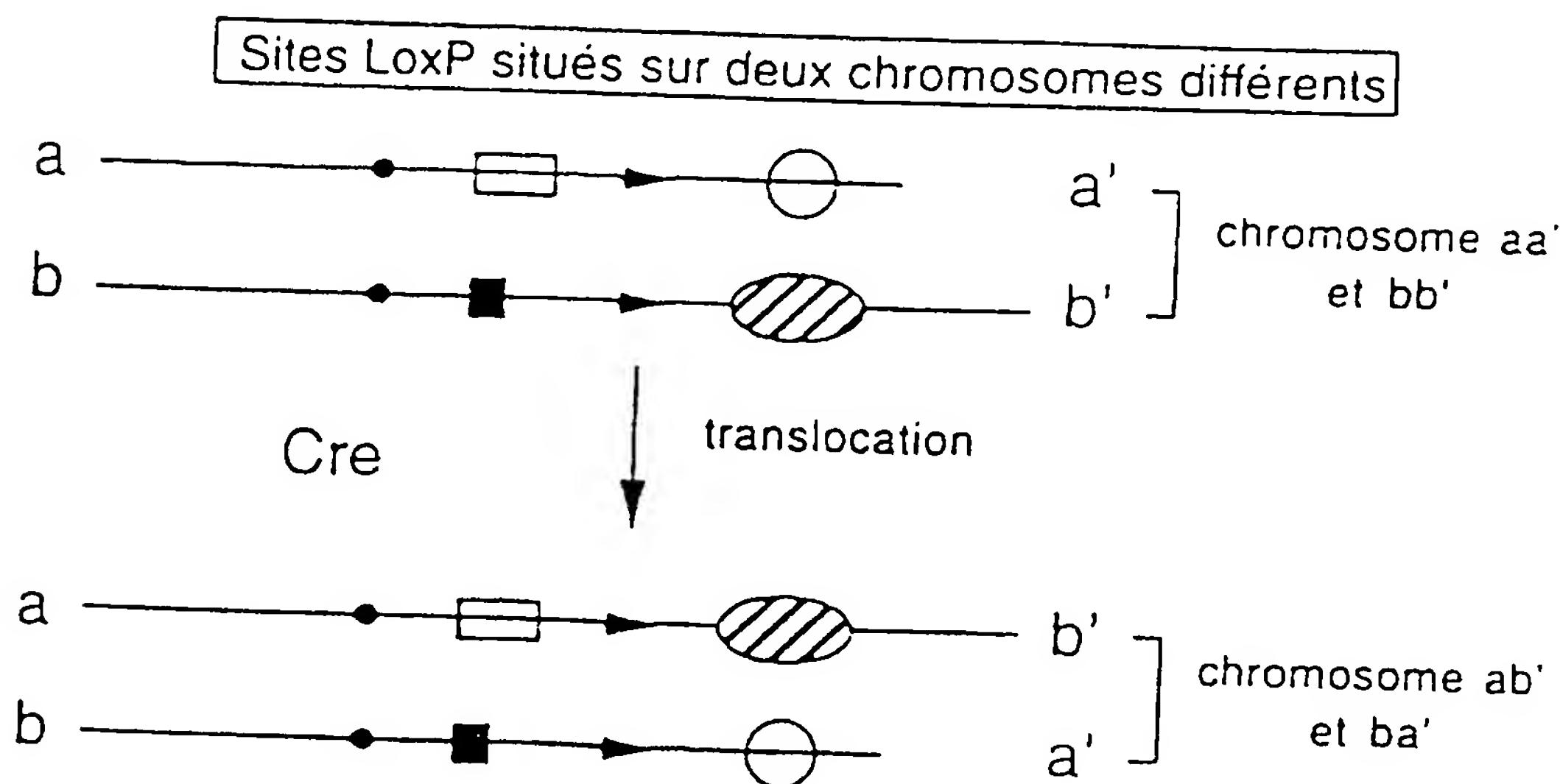
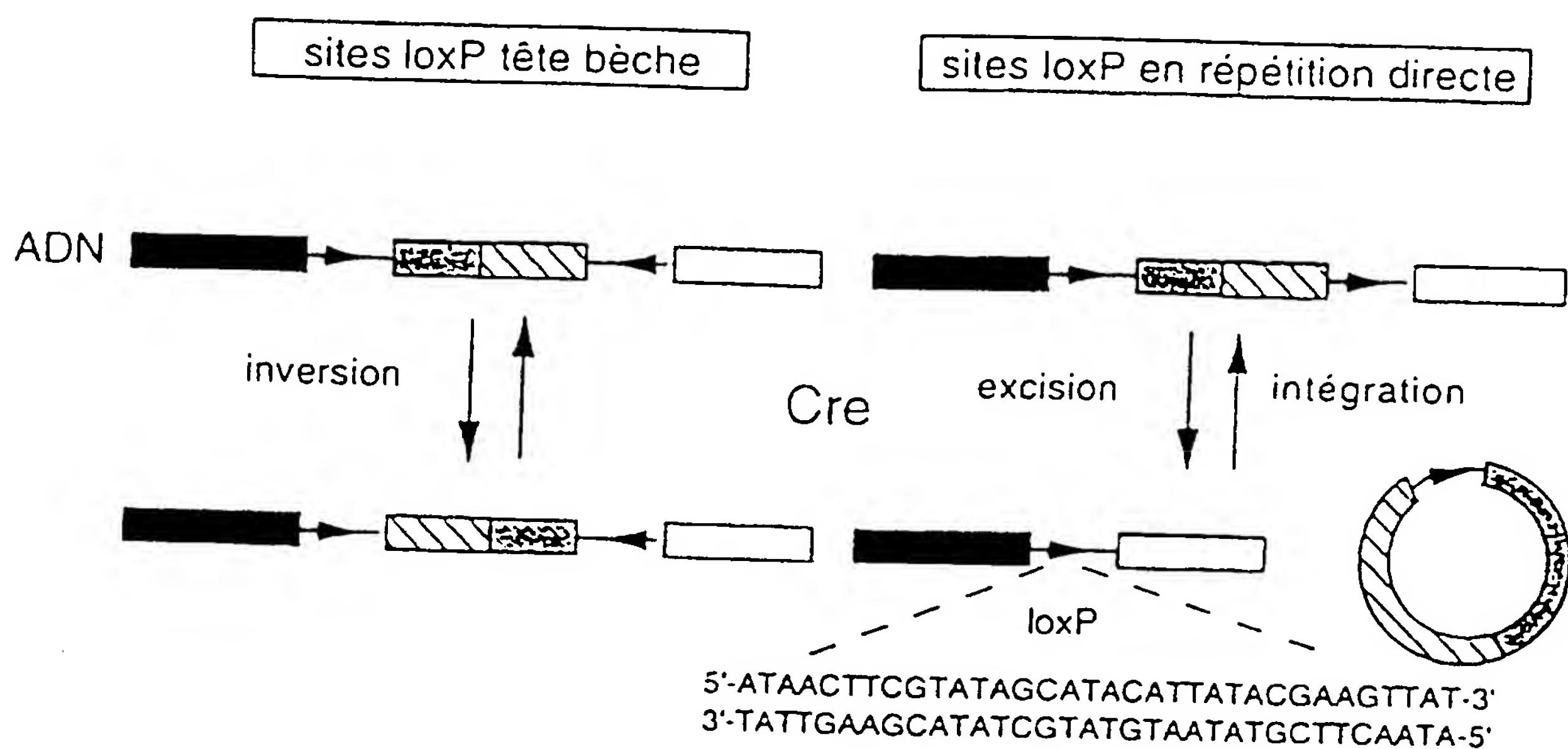


FIG.1

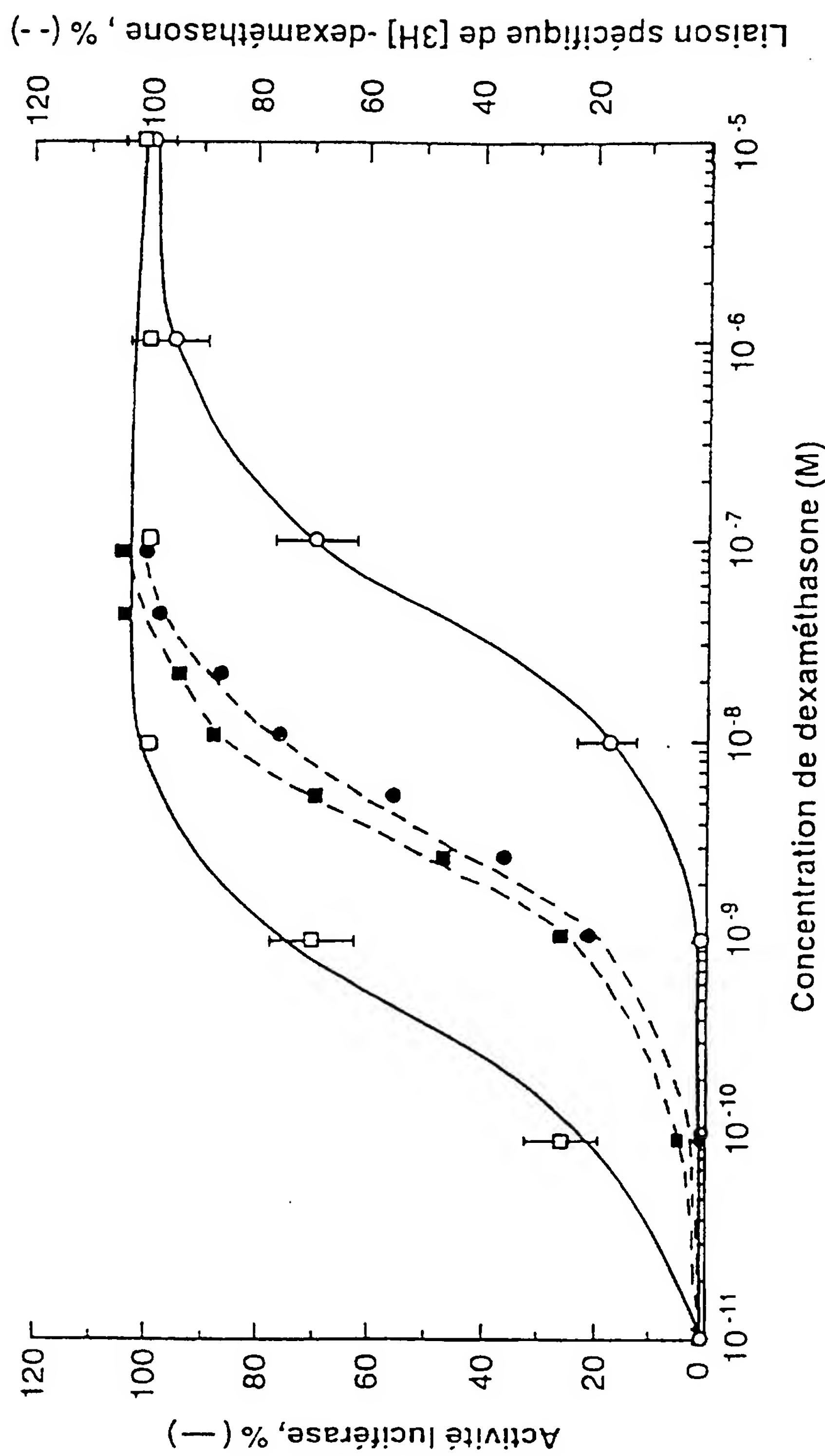


FIG. 2

3 / 18

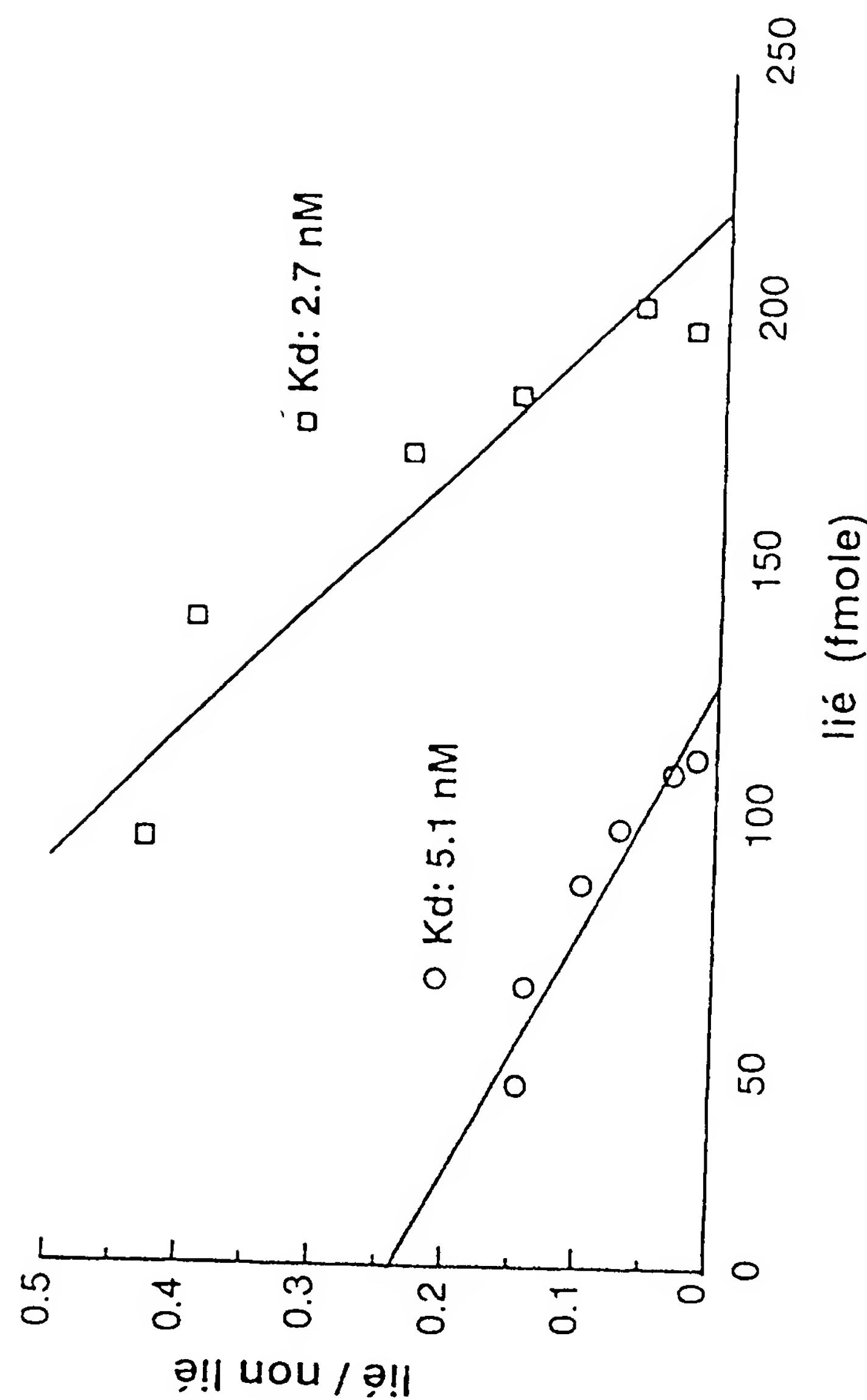


FIG. 3

4 / 18

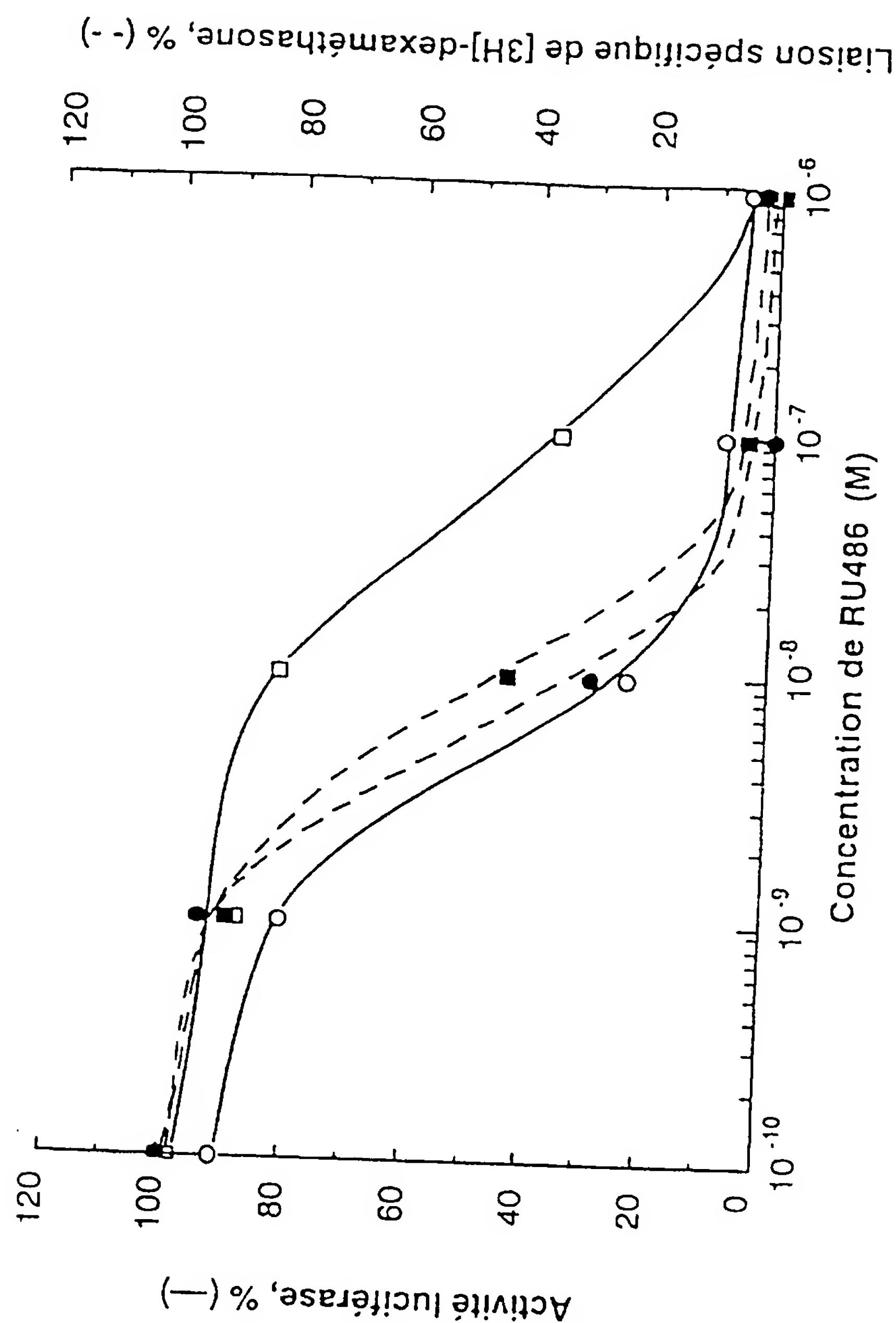
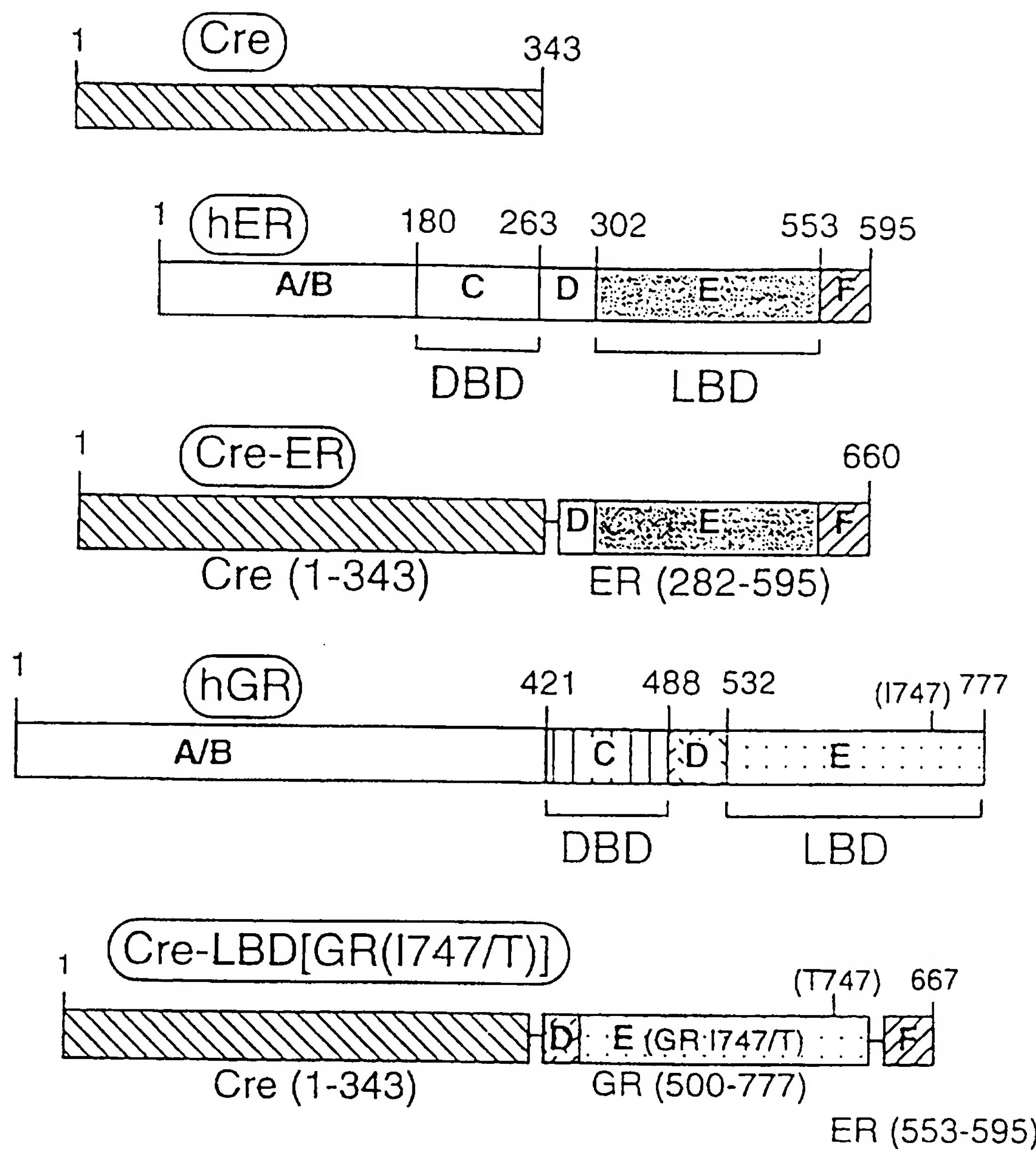
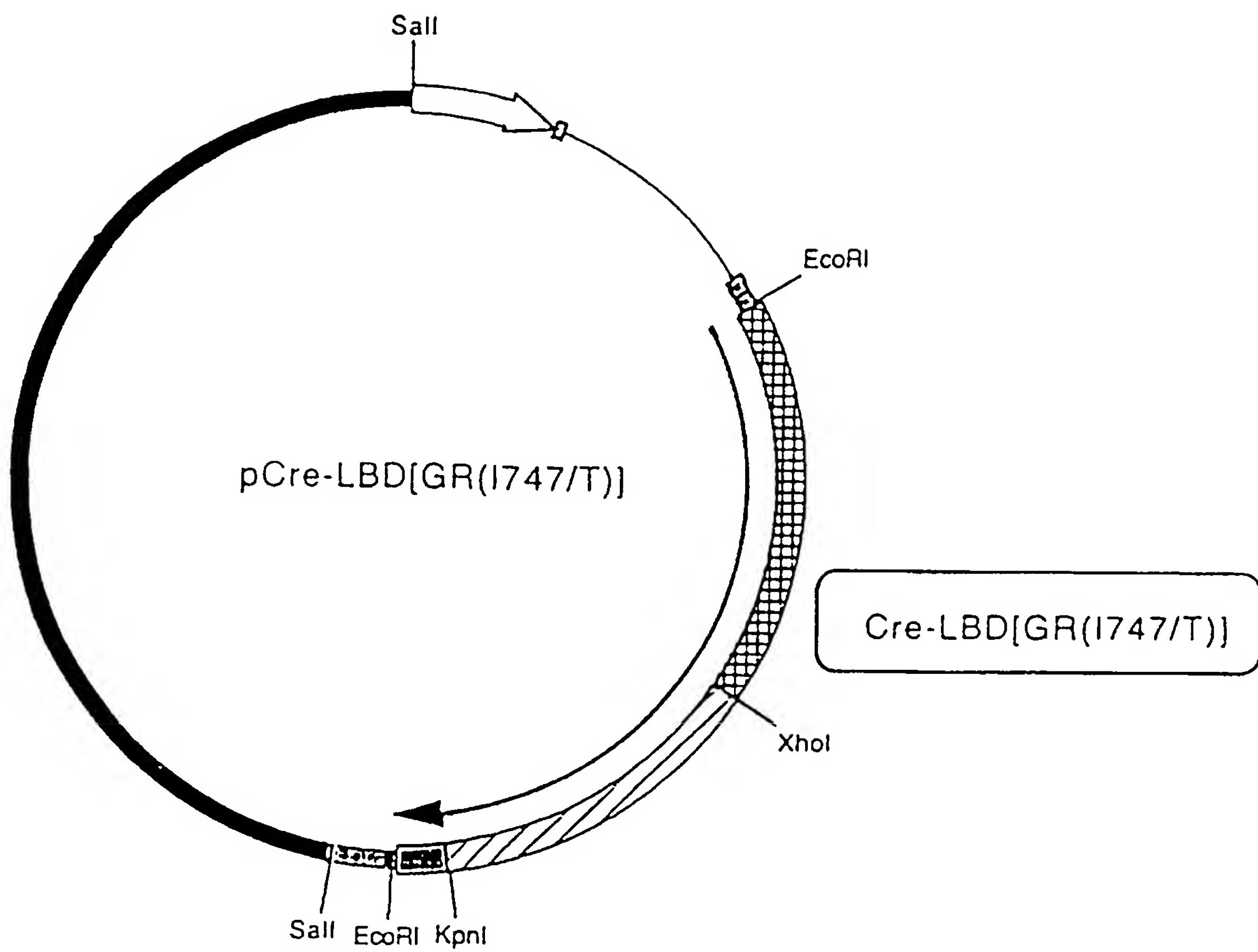


FIG. 4

FIG. 5



représentation schématique du plasmide pCre-LBD[GR(I747/T)]

Les séquences codant pour Cre sont représentées par [██████]

pour les aa 500-777 de hGR(I747/T) par [|||||]

pour les aa 553-595 de hER par [███]

FIG. 6

## Sall

1 GTCGACTTCT GAGGCCGGAAA GAACCAGCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG  
 51 GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAACCATGC  
 101 ATCTCAATT A GTCAGCAACC AGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA  
 151 GGCAGAAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC  
 201 GCCCCTAAGT CCGCCCATCC CGCCCTAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT  
 251 CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATT TT TT TA TTTATGCAGA GGCGGAGGCC  
 301 GCCTCGGCCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTGAGG  
 351 CCTAGGCTTT TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT  
 401 TTGGGGACCC TTGATTGTT TTTCTTTTC GCTATTGTA AATTCACTGTT  
 451 ATATGGAGGG GGCAAAGTT TCAGGGTGTGTT GTT TAGAATG GGAAGATGTC  
 501 CCTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTGTTTCTT TCACTTTCTA  
 551 CTCTGTTGAC AACCAATTGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCA TTTCTGTAAC  
 601 TTTTICGTTA AACTTTAGCT TGCAATTGTA ACGAATT TT AAATTCACTT  
 651 TTGTTTATTGTCAGATTGTT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTCAA  
 701 GGCAATCAGG GTATATTATA TTGTAATTCA GCACAGTTT AGAGAACAAAT  
 751 TGTTATAATT AAATGATAAG GTAGAATATT TCTGCATATA AATTCTGGCT  
 801 GGCGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT GGTCACTCATC  
 851 CTGCCCTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT ACACGTGTTG AGATGAGGAT  
 901 AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT  
 951 TCTTCTTTT CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTGCTGTCT

## EcoRI

1001 CATCATTG GCAAAGAATT GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTCCA  
 1051 CC ATG TCC AAT TTA CTG ACC GCA CAC CAA AAT TTG CCT GCA  
 1101 1► Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Glu Asn Leu Pro Ala  
 1092 TTA CCG GTC GAT GCA ACG AGT GAT GAG GTT CGC AAG AAC CTG  
 1141 14► Leu Pro Val Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu  
 1134 ATG GAC ATG TTC AGG GAT CGC CAG GCG TTT TCT GAG CAT ACC  
 1184 28► Met Asp Met Phe Arg Asp Arg Glu Ala Phe Ser Glu His Thr  
 1176 TGG AAA ATG CTT CTG TCC GTT TGC CGG TCG TGG GCG GCA TGG  
 1224 42► Trp Lys Met Leu Leu Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp  
 1218 TGC AAG TTG AAT AAC CGG AAA TGG TTT CCC GCA GAA CCT GAA  
 1268 56► Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe Pro Ala Glu Pro Glu  
 1260 GAT GTT CGC GAT TAT CTT CTA TAT CTT CAG GCG CGC GGT CTG  
 1310 70► Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Gly Leu  
 1302 GCA GTA AAA ACT ATC CAG CAA CAT TTG GGC CAG CTA AAC ATG  
 1352 84► Ala Val Lys Thr Ile Glu Glu His Leu Glu Glu Leu Asn Met  
 1344 CTT CAT CGT CGG TCC GGG CTG CCA CGA CCA AGT GAC AGC AAT  
 1394 98► Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn  
 1386 GCT GTT TCA CTG GTT ATG CGG CGG ATC CGA AAA GAA AAC GTT  
 1436 112► Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val  
 1428 GAT GCC GGT GAA CGT GCA AAA CAG GCT CTA GCG TTC GAA CGC  
 1476 126► Asp Ala Glu Glu Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ala Phe Glu Arg  
 1470 ACT GAT TTC GAC CAG GTT CGT TCA CTC ATG GAA AAT AGC GAT  
 1420 140► Thr Asp Phe Asp Glu Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp

8 / 18

1512 CGC TGC CAG GAT ATA CGT AAT CTG GCA TTT CTG GGG ATT GCT  
 154 ▶ Arg Cys Glu Asp Ile Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala  
 1554 TAT AAC ACC CTG TTA CGT ATA GCC GAA ATT GCC AGG ATC AGG  
 168 ▶ Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu Ile Ala Arg Ile Arg  
 1596 GTT AAA GAT ATC TCA CGT ACT GAC GGT GGG AGA ATG TTA ATC  
 182 ▶ Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Leu Ile  
 1638 CAT ATT GGC AGA ACG AAA ACG CTG GTT AGC ACC GCA GGT GTA  
 196 ▶ His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly Val  
 1680 GAG AAG GCA CTT AGC CTG GGG GTA ACT AAA CTG GTC GAG CGA  
 210 ▶ Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg  
 1722 TGG ATT TCC GTC TCT GGT GTA GCT GAT CCG AAT AAC TAC  
 224 ▶ Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr  
 1764 CTG TTT TGC CGG GTC AGA AAA AAT GGT GTT GCC GCG CCA TCT  
 238 ▶ Leu Phe Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser  
 1806 GCC ACC AGC CAG CTA TCA ACT CGC GCC CTG GAA GGG ATT TTT  
 252 ▶ Ala Thr Ser Glu Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe  
 1848 GAA GCA ACT CAT CGA TTG ATT TAC GGC GCT AAG GAT GAC TCT  
 266 ▶ Glu Ala Thr His Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser  
 1890 GGT CAG AGA TAC CTG GCC TGG TCT GGA CAC AGT GCC CGT GTC  
 280 ▶ Gly Glu Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val  
 1932 GGA GCC GCG CGA GAT ATG GCC CGC GCT GGA GTT TCA ATA CCG  
 294 ▶ Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Pro  
 1974 GAG ATC ATG CAA GCT GGT GCC TGG ACC AAT GTA AAT ATT GTC  
 308 ▶ Glu Ile Met Glu Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile Val  
 2016 ATG AAC TAT ATC CGT AAC CTG GAT AGT GAA ACA GGG GCA ATG  
 322 ▶ Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met

Xhol

2058 GTG CGC CTG CTG GAA GAT GCC GAT CTC GAG ATT CAG CAG GCC  
 336 ▶ Val Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Ile Glu Glu Ala  
 2100 ACT ACA GGA GTC TCA CAA GAA ACC TCT GAA AAT CCT GGT AAC  
 350 ▶ Thr Thr Gly Val Ser Glu Glu Thr Ser Glu Asn Pro Gly Asn  
 2142 AAA ACA ATA GTT CCT GCA ACG TTA CCA CAA CTC ACC CCT ACC  
 364 ▶ Lys Thr Ile Val Pro Ala Thr Leu Pro Glu Leu Thr Pro Thr  
 2184 CTG GTG TCA CTG TTG GAG GTT ATT GAA CCT GAA GTG TTA TAT  
 378 ▶ Leu Val Ser Leu Leu Glu Val Ile Glu Pro Glu Val Leu Tyr  
 2226 GCA GGA TAT GAT AGC TCT GTT CCA GAC TCA ACT TGG AGG ATC  
 392 ▶ Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Val Pro Asp Ser Thr Trp Arg Ile  
 2268 ATG ACT ACG CTC AAC ATG TTA GGA GGG CGG CAA GTG ATT GCA  
 406 ▶ Met Thr Thr Leu Asn Met Leu Gly Gly Arg Glu Val Ile Ala  
 2310 GCA GTG AAA TGG GCA AAG GCA ATA CCA GGT TTC AGG AAC TTA  
 420 ▶ Ala Val Lys Trp Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Arg Asn Leu  
 2352 CAC CTG GAT GAC CAA ATG ACC CTA CTG CAG TAC TCC TGG ATG  
 434 ▶ His Leu Asp Asp Glu Met Thr Leu Leu Glu Tyr Ser Trp Met  
 2394 TTT CTT ATG GCA TTT GCT CTG GGG TGG AGA TCA TAT AGA CAA  
 448 ▶ Phe Leu Met Ala Phe Ala Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Arg Glu  
 2436 TCA AGT GCA AAC CTG CTG TGT TTT GCT CCT GAT CTG ATT ATT  
 462 ▶ Ser Ser Ala Asn Leu Leu Cys Phe Ala Pro Asp Leu Ile Ile

FIG. 7B

2478 AAT GAG CAG AGA ATG ACT CTA CCC TGC ATG TAC GAC CAA TGT  
 476► Asn Glu Glu Arg Met Thr Leu Pro Cys Met Tyr Asp Glu Cys  
 2520 AAA CAC ATG CTG TAT GTT TCC TCT GAG TTA CAC AGG CTT CAG  
 490► Lys His Met Leu Tyr Val Ser Ser Glu Leu His Arg Leu Glu  
 2562 GTA TCT TAT GAA GAG TAT CTC TGT ATG AAA ACC TTA CTG CTT  
 504► Val Ser Tyr Glu Glu Tyr Leu Cys Met Lys Thr Leu Leu Leu  
 2604 CTC TCT TCA GTT CCT AAG GAC GGT CTG AAG AGC CAA GAG CTA  
 518► Leu Ser Ser Val Pro Lys Asp Gly Leu Lys Ser Glu Glu Leu  
 2646 TTT GAT GAA ATT AGA ATG ACC TAC ATC AAA GAG CTA GGA AAA  
 532► Phe Asp Glu Ile Arg Met Thr Tyr Ile Lys Glu Leu Gly Lys  
 2688 GCC ATT GTC AAG AGG GAA GGA AAC TCC AGC CAG AAC TGG CAG  
 546► Ala Ile Val Lys Arg Glu Gly Asn Ser Ser Glu Asn Trp Glu  
 2730 CGG TTT TAT CAA CTG ACA AAA CTC TTG GAT TCT ATG CAT GAA  
 560► Arg Phe Tyr Glu Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Met His Glu  
 2772 GTG GTT GAA AAT CTC CTT AAC TAT TGC TTC CAA ACA TTT TTG  
 574► Val Val Glu Asn Leu Leu Asn Tyr Cys Phe Glu Thr Phe Leu  
 2814 GAT AAG ACC ATG TCC ACC GAG TTC CCC GAG ATG TTA CCT GAA  
 588► Asp Lys Thr Met Ser Thr Glu Phe Pro Glu Met Leu Ala Glu  
 2856 ATC ATC ACC AAT CAG ATA CCA AAA TAT TCA AAT GGA AAT ATC  
 602► Ile Ile Thr Asn Glu Ile Pro Lys Tyr Ser Asn Gly Asn Ile

KpnI

2898 AAA AAA CTT CTG TTT CAT CAA AAG GGT ACC AGC CGT GGA GGG  
 616► Lys Lys Leu Leu Phe His Glu Lys Glu Thr Ser Arg Glu Glu  
 2940 GCA TCC GTG GAG GAG ACG GAC CAA AGC CAC TTG GCC ACT GCG  
 630► Ala Ser Val Glu Glu Thr Asp Glu Ser His Leu Ala Thr Ala  
 2982 GGC TCT ACT TCA TCG CAT TCC TTG CAA ARG TAT TAC ATC ACG  
 644► Glu Ser Thr Ser Ser His Ser Leu Glu Lys Tyr Tyr Ile Thr  
 3024 GGG GAG GCA GAG GGT TTC CCT GCC ACA GTC TGA GAGCTCCCTG  
 658► Glu Glu Ala Glu Glu Phe Pro Ala Thr Val ...

EcoRI

3067 GAATTGGAT CTTATTAAAG CAGAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT  
 3117 TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTC ACAAAATAAG CATTTTTTTC  
 3167 ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA TCTTATCATG

SalI

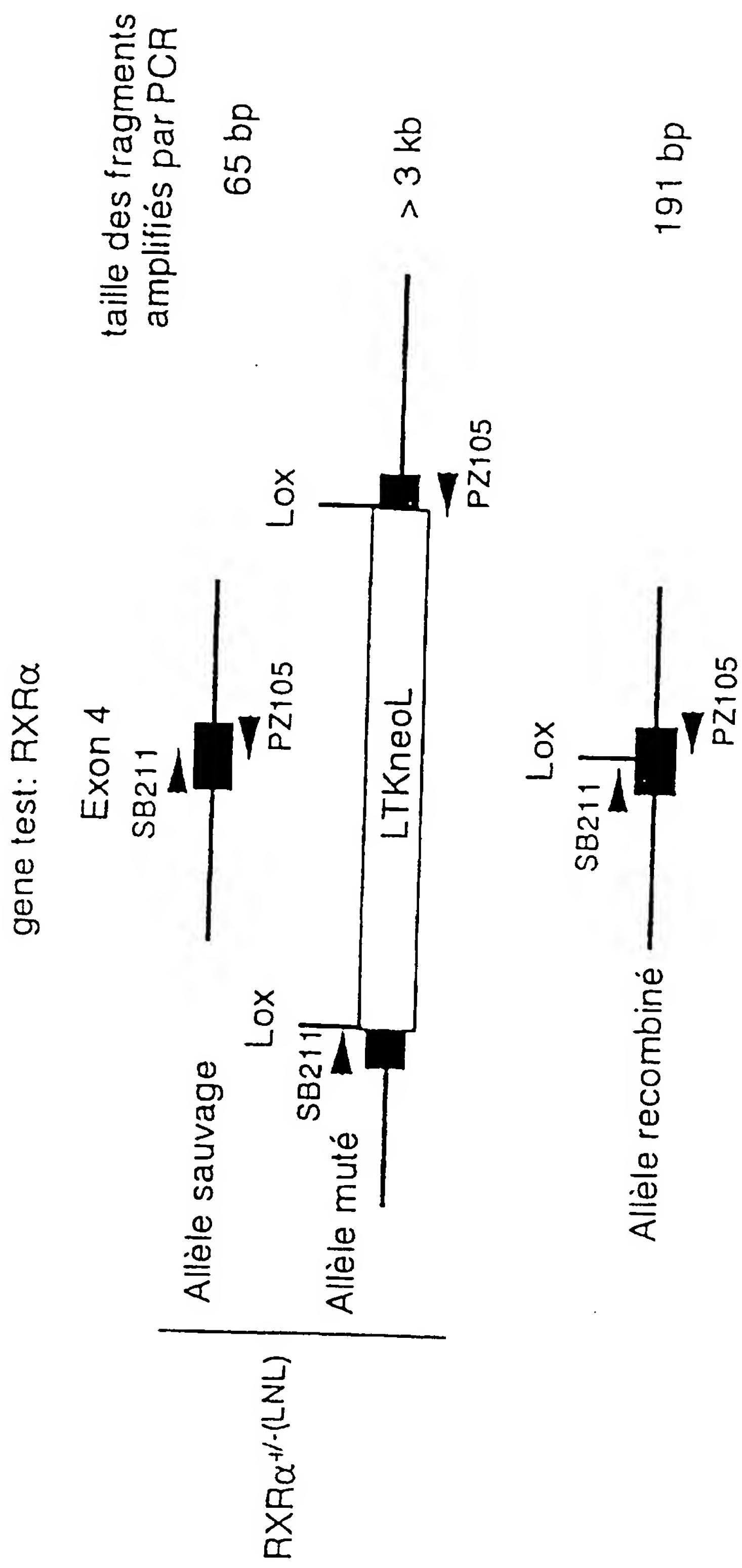
3217 TCTGGTCGAC TCTAGACTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC  
 3267 TCGGTGTTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT  
 3317 ACGGTTATCC ACAGAACATAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA  
 3367 AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT  
 3417 TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG  
 3467 TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC  
 3517 CTGGAAGCTC CCTCGTGCAC TCTCCTGTT CGACCCCTGCC GCTTACCGGA  
 3567 TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC  
 3617 ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT  
 3667 GTGTGCACGA ACCCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC  
 3717 TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC  
 3767 AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG  
 3817 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATT  
 3867 GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG  
 3917 CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT

1 0 / 1 8

3967 GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG  
 4017 ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAGT CACGTTAAGG  
 4067 GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTAA  
 4117 ATTAAAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG  
 4167 TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG  
 4217 TCTATTCGT TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA  
 4267 CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA  
 4317 GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACCG AGCCAGCCGG  
 4367 AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT  
 4417 CTATTAATTG TTGCCGGAA GCTAGAGTAA GTAGTCGCC AGTTAATAGT  
 4467 TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC  
 4517 GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGGGAGTTA  
 4567 CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCCTCCG  
 4617 ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC  
 4667 AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTCTG  
 4717 TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGGCGA  
 4767 CCGACTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG  
 4817 CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC  
 4867 TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT  
 4917 GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG  
 4967 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC  
 5017 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTT TTCAATATTA TTGAAGCATT  
 5067 TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTGAAAT GTATTAGAA  
 5117 AAATAAACAA ATAGGGGTTG CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG  
 5167 ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT  
 5217 ATCACGAGGC CCCTTCGTC TCGCGCGTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC  
 5267 TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT  
 5317 GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGGGGTG TTGGCGGGTG  
 5367 TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
 5417 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC  
 5467 ATCAGGAAAT TGTAAACGTT AATATTGT TAAAATTGCG GTTAAATTGTT  
 5517 TGTAAATCA GCTCATTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC  
 5567 TTATAAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGT GTTCCAGTTT  
 5617 GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA  
 5667 AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCTAATC  
 5717 AAGTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC ACTAAATCGG AACCTAAAG  
 5767 GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA  
 5817 AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT  
 5867 AGCGGTACG CTGCGCGTAA CCACCAACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCCGC  
 5917 TACAGGGCGC GTCGCGCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA  
 5967 GGGCGATCGG TGCAGGGCCTC TTGCTATTCA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG  
 6017 ATGTGCTGCA AGGCGATTAA GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC  
 6067 GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATT

FIG. 7D

11 / 18



1 2 / 1 8

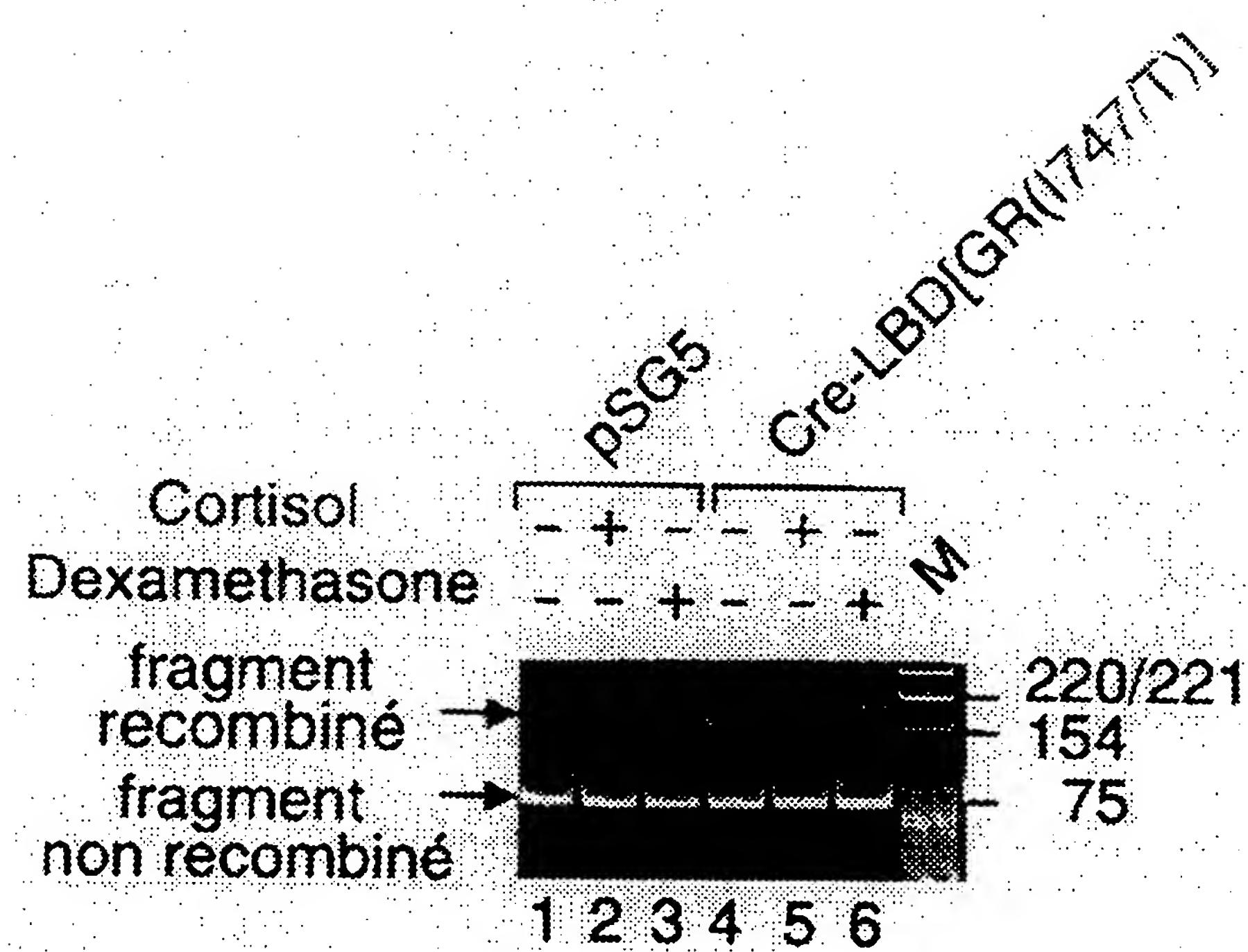


FIG. 9

1 3 / 1 8

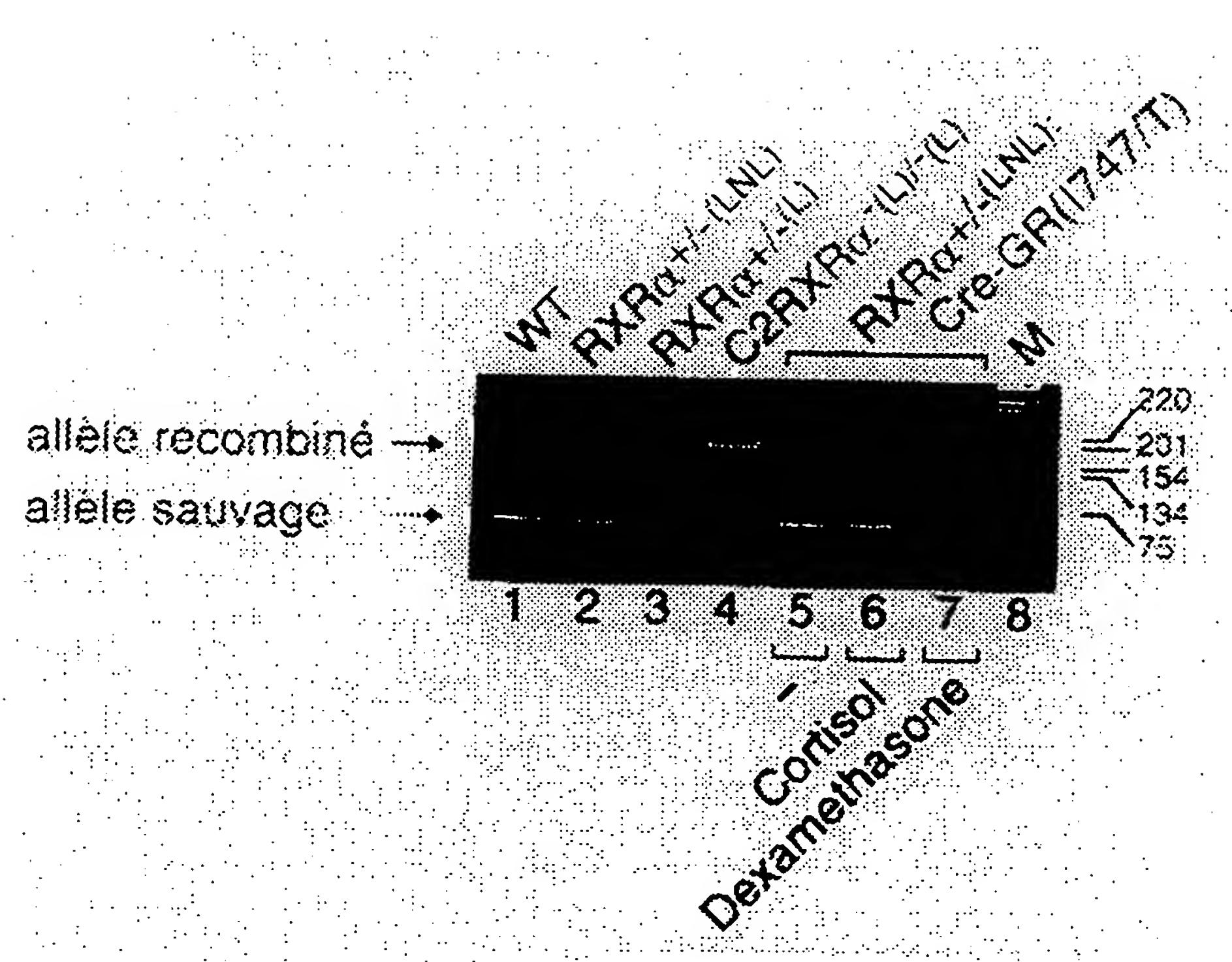


FIG. 10

14 / 18

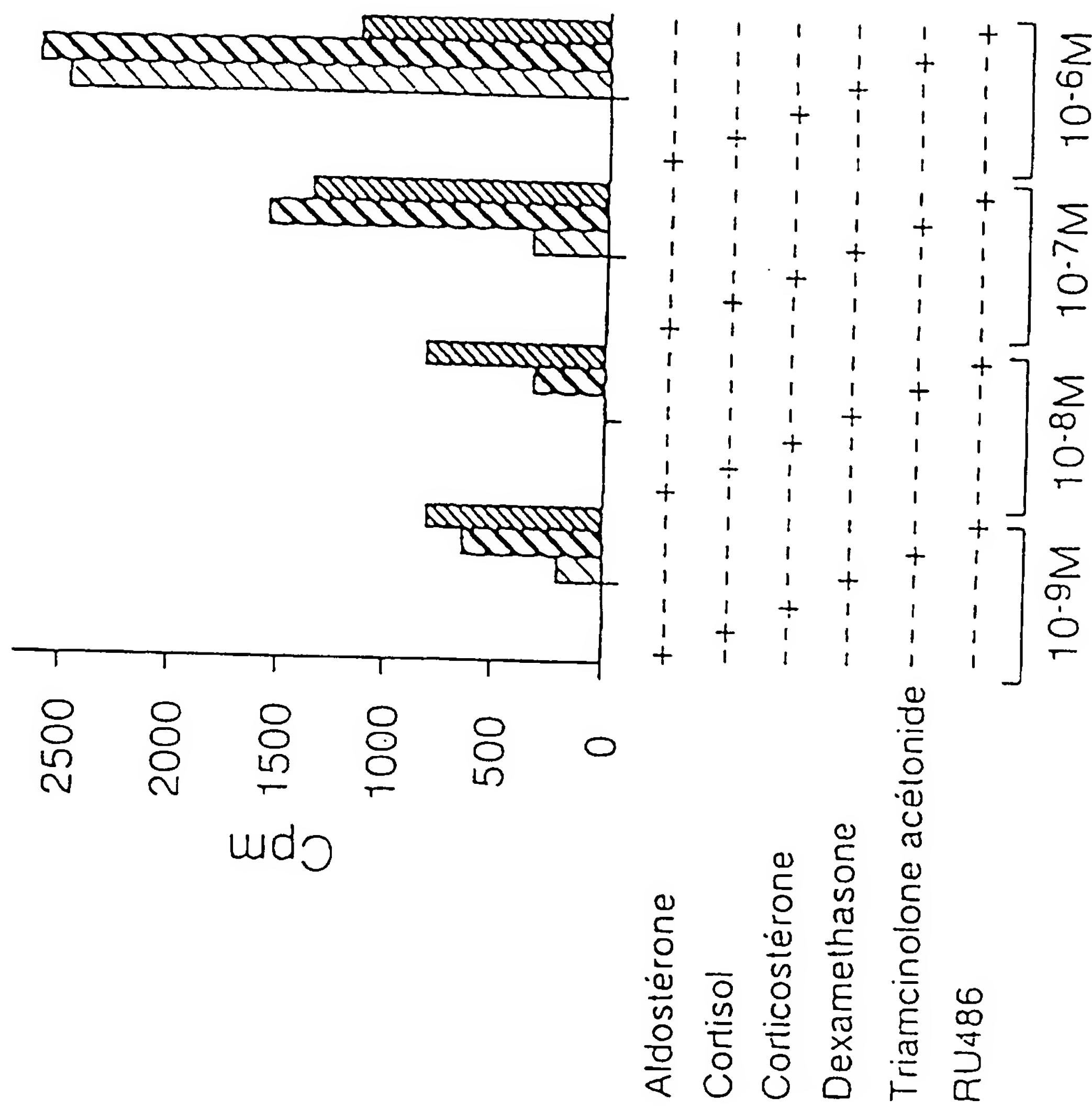


FIG. 11

15 / 18

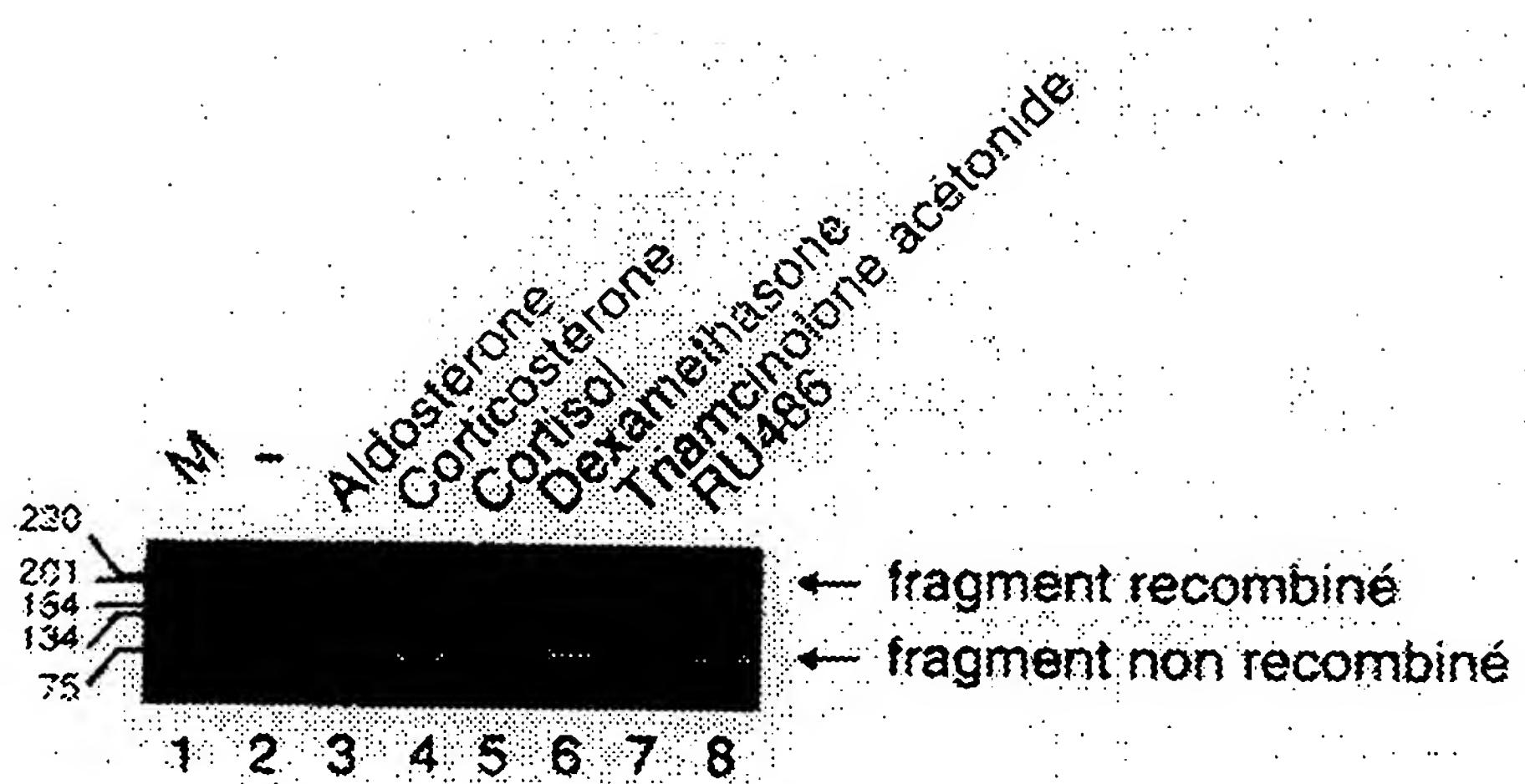


FIG. 12

1 6 / 1 8

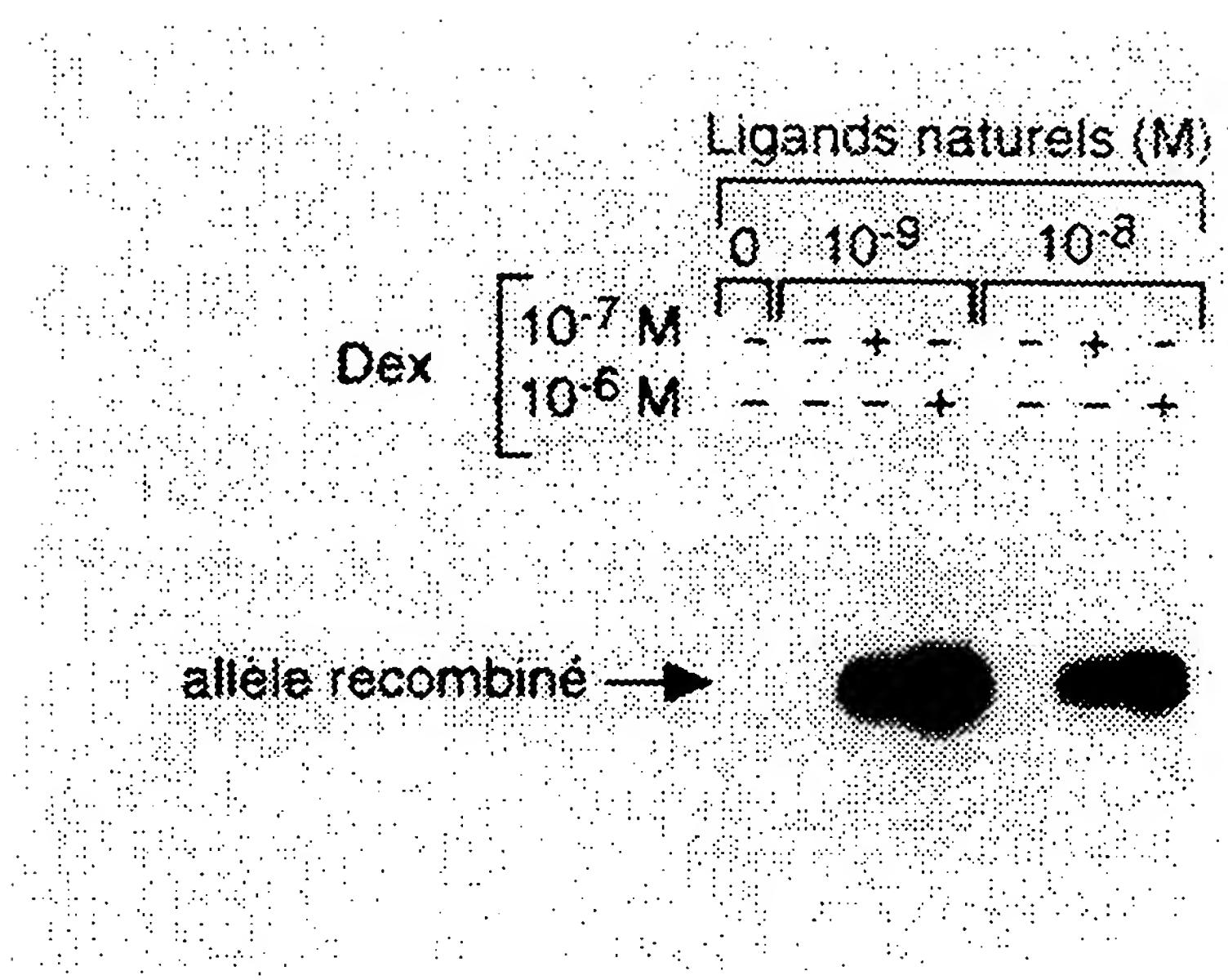
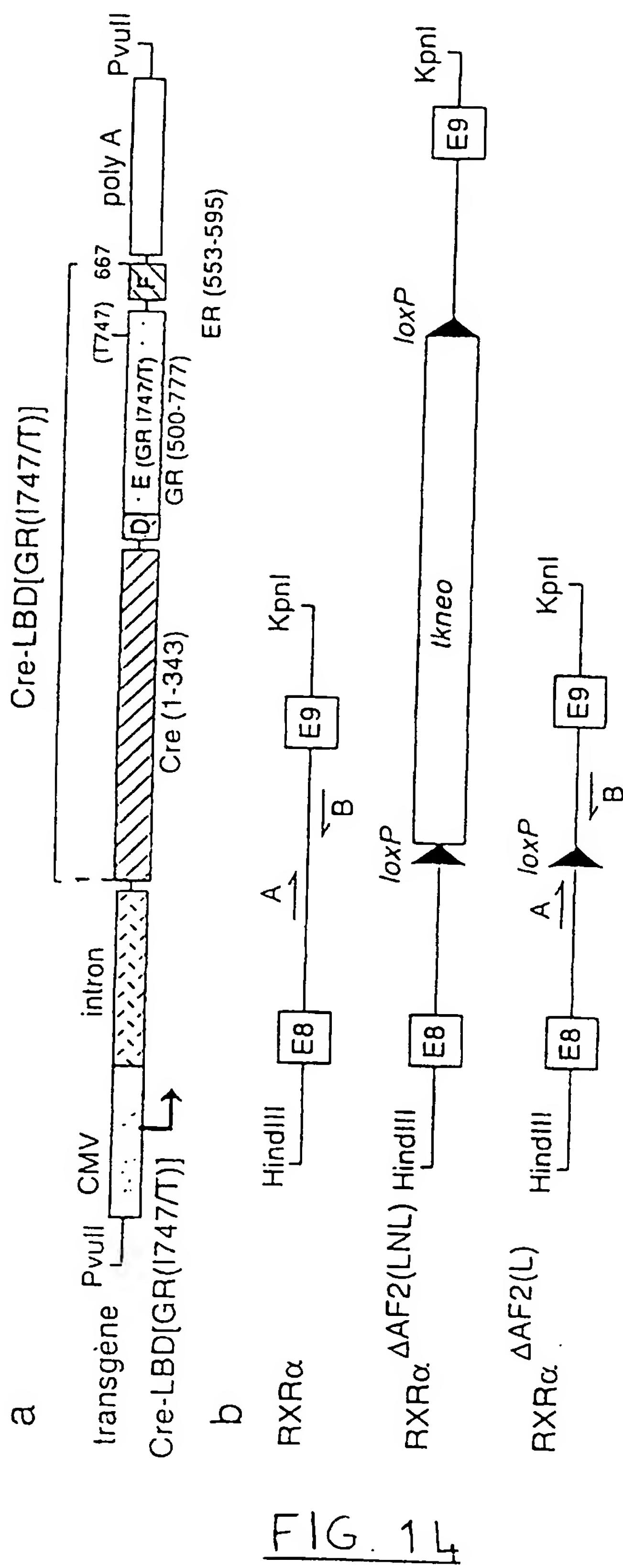


FIG.13



18 / 18

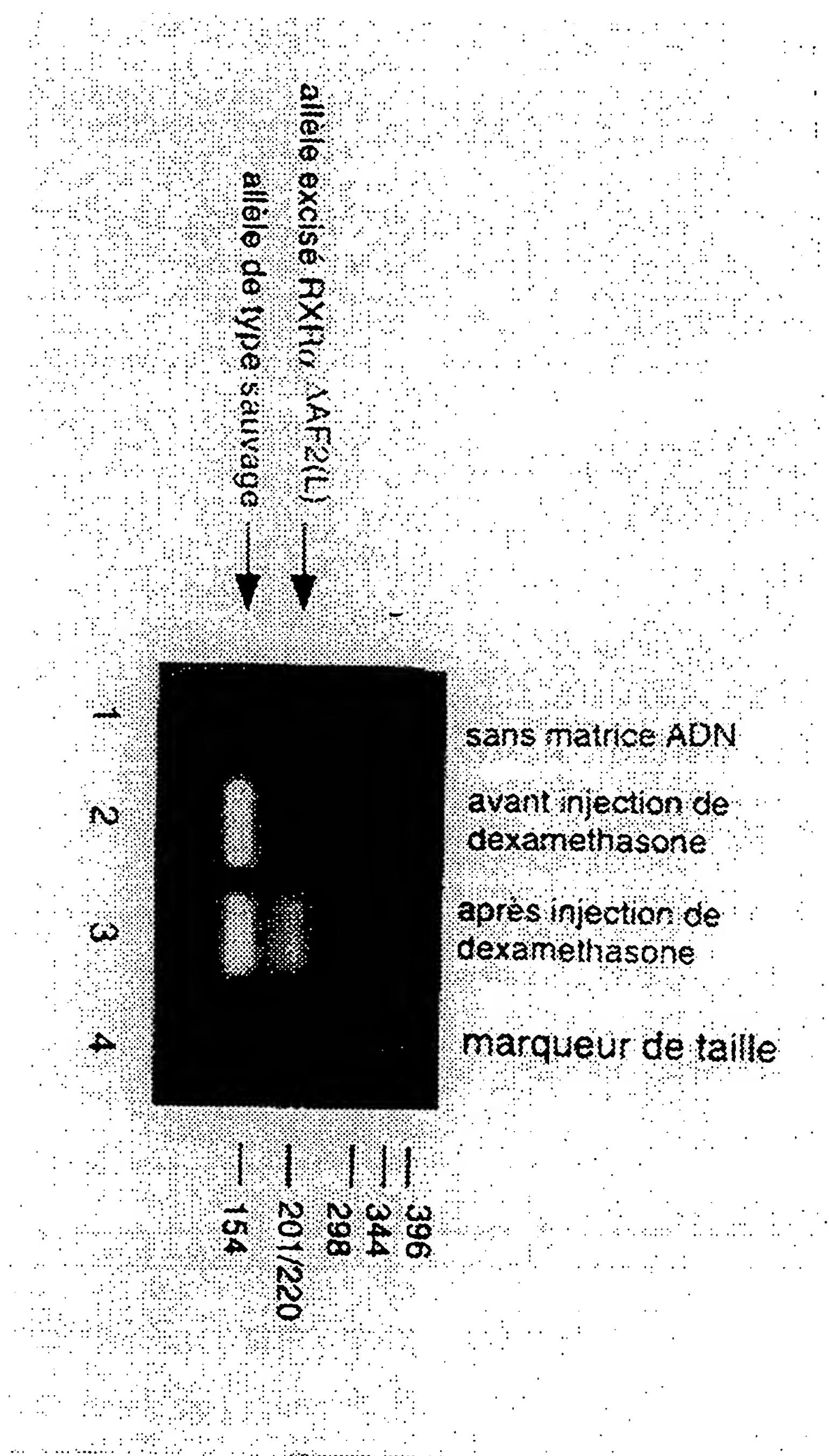


FIG 15

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/72 C12N15/62 A01K67/027 A61K38/16  
C12N15/90 C12N9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A01K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 46, 18 November 1994, pages 29010-29015, XP000611464 N. WARRIAR ET AL.: "Hormone binding domain of human glucocorticoid receptor." cited in the application see the whole document	1,5,9,12
Y	---	2-4,6-8, 10,11,13
X	J. BIOL. CHEM., vol. 266, no. 33, 25 November 1991, pages 22075-22078, XP000611463 P.K. CHAKRABORTI ET AL.: "Creation of "Super" Glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain." cited in the application see the whole document	1,5,9,12
Y	---	2-4,6-8, 10,11,13
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

10 June 1997

Date of mailing of the international search report

01.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 2, February 1995, pages 1005-1013, XP000564501 W. LIU ET AL.: "Hormone-independent repression of AP-1-Inducible collagenase promoter activity by Glucocorticoid receptors." see the whole document ---	1,5,9,12
Y	J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 11, 18 March 1994, pages 7914-7918, XP002011282 D. CHEN ET AL.: "The hormone-binding role of 2 cysteines near the C terminus of the mouse glucocorticoid receptor." cited in the application see the whole document	2-4,6-8, 10,11,13
X	NATURAL STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 3, 1 January 1996, pages 87-94, XP000610199 J-M. WURTZ ET AL.: "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." cited in the application Table 1 see the whole document ---	1,5,9,12
Y	WO 88 03168 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 5 May 1988 see page 44 - page 86 ---	2-4,6-8, 10,11,13
X	WO 90 07517 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 12 July 1990 see the whole document ---	1,5,9,12
X	US 5 215 916 A (SIMONS, JR. ET AL.) 1 June 1993 see the whole document ---	1,5,9,12
X	JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 55 (2). 1995. 135-146. ISSN: 0960-0760, XP000610413 JEWELL C M ET AL: "Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors." see the whole document ---	1,5,9,12
	-/-	

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY 11 (1). 1994. 42-48. ISSN: 1044-1549, XP000610412 LANE S J ET AL: "Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid -resistant bronchial asthma." see the whole document ---	1,5,9,12
X	US 5 468 624 A (THOMPSON E BRAD ET AL) 21 November 1995 see the whole document ---	1-9
A	J. CLIN. INVEST., vol. 87, no. 2, February 1991, pages 680-686, XP000610523 HURLEY ET AL.: "Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance." cited in the application see the whole document ---	
A	J. CLIN. INVEST., vol. 91, no. 5, May 1993, pages 1918-1925, XP000610522 D.M. MALCHOFF ET AL.: "A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance." cited in the application see the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8803168 A	05-05-88	US 5071773 A AU 616389 B AU 8238887 A EP 0287653 A EP 0733705 A JP 1500964 T US 5597705 A US 5534418 A US 5606021 A US 5312732 A US 5298429 A	10-12-91 31-10-91 25-05-88 26-10-88 25-09-96 06-04-89 28-01-97 09-07-96 25-02-97 17-05-94 29-03-94
-----			
WO 9007517 A	12-07-90	AU 633045 B AU 4956290 A CA 2006657 A EP 0451206 A US 5578483 A US 5602009 A	21-01-93 01-08-90 23-06-90 16-10-91 26-11-96 11-02-97
-----			
US 5215916 A	01-06-93	AU 2193092 A WO 9222567 A	12-01-93 23-12-92
-----			
US 5468624 A	21-11-95	US 5571791 A	05-11-96
-----			

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/12 C07K14/72  
C12N15/90 C12N9/00

C12N15/62

A01K67/027

A61K38/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K C12N A01K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 46, 18 Novembre 1994, pages 29010-29015, XP000611464 N. WARRIOR ET AL.: "Hormone binding domain of human glucocorticoid receptor." cité dans la demande voir le document en entier	1,5,9,12
Y	---	2-4,6-8, 10,11,13
X	J. BIOL. CHEM., vol. 266, no. 33, 25 Novembre 1991, pages 22075-22078, XP000611463 P.K. CHAKRABORTI ET AL.: "Creation of "Super" Glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain." cité dans la demande voir le document en entier	1,5,9,12
Y	---	2-4,6-8, 10,11,13
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01.07.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hix, R

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistes
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 2, Février 1995, pages 1005-1013, XP000564501 W. LIU ET AL.: "Hormone-independent repression of AP-1-Inducible collagenase promoter activity by Glucocorticoid receptors." voir le document en entier	1,5,9,12  2-4,6-8, 10,11,13
X	J. BIOL. CHEM., vol. 269, no. 11, 18 Mars 1994, pages 7914-7918, XP002011282 D. CHEN ET AL.: "The hormone-binding role of 2 cysteines near the C terminus of the mouse glucocorticoid receptor." cité dans la demande	1,5,9,12
Y	voir le document en entier	2-4,6-8, 10,11,13
X	NATURAL STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 3, 1 Janvier 1996, pages 87-94, XP000610199 J-M. WURTZ ET AL.: "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." cité dans la demande	1,5,9,12
Y	Table 1 voir le document en entier	2-4,6-8, 10,11,13
X	WO 88 03168 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 5 Mai 1988 voir page 44 - page 86	1,5,9,12
X	WO 90 07517 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 12 Juillet 1990 voir le document en entier	1,5,9,12
X	US 5 215 916 A (SIMONS, JR. ET AL.) 1 Juin 1993 voir le document en entier	1,5,9,12
X	JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 55 (2). 1995. 135-146. ISSN: 0960-0760, XP000610413 JEWELL C M ET AL: "Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors." voir le document en entier	1,5,9,12
	---	
	-/-	

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY 11 (1). 1994. 42-48. ISSN: 1044-1549, XP000610412 LANE S J ET AL: "Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid -resistant bronchial asthma." voir le document en entier ---	1,5,9,12
X	US 5 468 624 A (THOMPSON E BRAD ET AL) 21 Novembre 1995 voir le document en entier ---	1-9
A	J. CLIN. INVEST., vol. 87, no. 2, Février 1991, pages 680-686, XP000610523 HURLEY ET AL.: "Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance." cité dans la demande voir le document en entier ---	
A	J. CLIN. INVEST., vol. 91, no. 5, Mai 1993, pages 1918-1925, XP000610522 D.M. MALCHOFF ET AL.: "A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance." cité dans la demande voir le document en entier -----	

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8803168 A	05-05-88	US 5071773 A AU 616389 B AU 8238887 A EP 0287653 A EP 0733705 A JP 1500964 T US 5597705 A US 5534418 A US 5606021 A US 5312732 A US 5298429 A	10-12-91 31-10-91 25-05-88 26-10-88 25-09-96 06-04-89 28-01-97 09-07-96 25-02-97 17-05-94 29-03-94
-----			
WO 9007517 A	12-07-90	AU 633045 B AU 4956290 A CA 2006657 A EP 0451206 A US 5578483 A US 5602009 A	21-01-93 01-08-90 23-06-90 16-10-91 26-11-96 11-02-97
-----			
US 5215916 A	01-06-93	AU 2193092 A WO 9222567 A	12-01-93 23-12-92
-----			
US 5468624 A	21-11-95	US 5571791 A	05-11-96
-----			